Aus dem Physiologisch-chemischen Institut II
der Philipps-Universität Marburg

Direktor: Prof. Dr. Fr. Schneider

Untersuchungen über die Kultivierung von Ehrlich-Ascites Tumorzellen in chemisch definierten Medien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

REGINA E. TESCHNER

aus Nidderau I

Marburg 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut II
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. Fr. Schneider

Untersuchungen über die Kultivierung von Ehrlich-Ascites Tumorzellen in chemisch definierten Medien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

REGINA E. TESCHNER

aus Nidderau I

Marburg 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 2I.8.I978

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof.Dr.F.Neurath
Referent: Prof.Dr.Fr.Schneider
Correferent: Prof.Dr.D.Schachtschabel

Die vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter der Leitung von

Herrn Prof.Dr.Fr.Schneider

im Physiologisch-chemischen Institut II der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Herrn Prof.Dr.Fr.Schneider danke ich für die großzügige Förderung der Untersuchungen und für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Ebenso danke ich Frau Dr.M.Löffler und Herrn Dr.S.Postius für Anleitung und Beratung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Käss danke ich für die sorgfältige Anfertigung der Zeichnungen.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Material und Methoden	3
2.1.	Zellmaterial	3
2.2.	Zellzucht in vivo und in vitro	3
2.2.1.	Kulturmedien	3
2.2.2.	Ansetzen der Kulturen	5
2.2.3.	Bestimmung der Zelldichte	6
2.2.4.	Bestimmung von Vitalität und Totzahl der Zellen	7
2.3.	Messung von Glykolyse und Atmung	8
2.4.	Messung des Proteingehalts, der DNA- und RNA-Synthese	8
2.4.1.	Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	8
2.4.2.	Einbau von ^{14}C-Lysin und ^{14}C-Leucin	9
2.4.3.	Einbau von ^{14}C-Thymidin und ^{14}C-Uridin	10
2.5.	Messung verschiedener Transportparameter	10
2.5.1.	Aufnahme von ^{14}C-Aminoisobuttersäure und ^{14}C-Cycloleucin	10
2.5.2.	Aufnahme von 2-Desoxy-D-^{3}H-Glucose	11
2.5.3.	Aufnahme von Methyl ^{3}H-Cholin	11
2.6.	Bestimmung des Lipidgehaltes und der Lipidsynthese	12
2.6.1.	Gravimetrische Messung der Gesamtlipide	12
2.6.2.	Messung der Lipidsynthese mittels radioaktiver Vorstufen	13
2.6.3.	Chromatographische Trennung der Gesamtlipide	14
2.6.4.	Chromatographische Trennung der Phospholipide	15
2.6.5.	Identifizierung und Quantifizierung der Phospholipide	16
2.6.6.	Cholesterinbestimmung	17

		Seite
2.7.	Aminosäureanalyse	17
2.8.	Zellzyklusverteilung	18
2.9.	Darstellung und Fehlerbreite der Ergebnisse	19
3.	Ergebnisse	2o
3.1.	Einfluß verschiedener Albuminmedien auf Zellwachstum und Stoffwechselaktivitäten von EAT-Zellen	2o
3.1.1.	Einfluß der Cohnfraktion V und des reinsten RSA auf Zellwachstum und Stoffwechselaktivitäten von EAT-Zellen	2O
3.1.2.	Beziehungen zwischen Albuminkonzentration und Wachstum sowie Stoffwechselaktivitäten von EAT-Zellen	27
3.1.3.	Einfluß der Cohnfraktion V verschiedener Herkunft auf das Wachstum von EAT-Zellen	31
3.1.4.	Einfluß verschiedener Fraktionen von Humanserumalbumin	34
3.2.	EAT-Zellen in Albuminmedien mit unterschiedlichen Zusätzen	34
3.2.1.	Wirkung von Spurenelementen,Fe, Vitaminen und Insulin	34
3.2.2.	Einfluß von Spermidin und Polylysin	35
3.2.3.	Effekt des pH-Wertes des Mediums auf Wachstum und Thymidineinbau	35
3.2.4.	Auswirkungen der Dialyse der Albuminfraktionen	37
3.2.5.	Wirkung von Äthylendiamintetraessigsäure	39
3.2.6.	Effekt von N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure (Hepes)	4o
3.3.	EAT-Zellen in variierten Normalmedien	41
3.3.1.	Medium mit dialysiertem Pferdeserum	41
3.3.2.	Medium mit 1o% Kalbsserum	42
3.3.3.	EAT-Zellen im Brutschrank mit Dreheinrichtung	46
3.4.	Vergleich der Stoffwechselaktivitäten in NM und AM über mehrere Passagen in vitro	47

		Seite
3.5.	Veränderungen im Lipidstoffwechsel	58
3.5.1.	Zunahme an Gesamtlipiden	58
3.5.2.	Messung der Synthese von Phospholipiden	6o
4.	Diskussion	65
4.1.	Vermehrung und Vitalität von EAT-Zellen in Normal- und Albuminmedium	65
4.2.	Albumin als"Wachstumsfaktor"	66
4.3.	Transport von Aminosäuren, Glucose und Cholin in Albuminmedien	7o
4.4.	Biosynthese von Makromolekülen	74
4.5.	Variierte Albuminmedien	78
4.5.1.	Einfluß von Polyaminen	78
4.5.2.	Einfluß von Spurenelementen,Fe, Vitaminen und Insulin	8o
4.5.3.	Einfluß des pH-Wertes des Mediums	81
4.6.	Änderungen im Lipidstoffwechsel von EAT-Zellen bei Serummangel	83
4.7.	Vergleich des Einflusses von Kalbs- und Pferdeserum auf die Syntheseleistungen von EAT-Zellen	86
4.8.	Veränderungen der Stoffwechselaktivitäten von EAT-Zellen im Hinblick auf den Zellzyklus	87
4.9.	Vergleich der Wachstumsraten von EAT-Zellen bei kontinuierlicher und diskontinuierlicher Bewegung der Zellkulturen	88
5.	Zusammenfassung	9o
6.	Literaturverzeichnis	93

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AIB	2-Aminoisobuttersäure
AM	Medium mit Albumin
o.5-AM-S	Medium mit Zusatz von o.5% Rinderserumalbumin (Cohnfraktion V) von Serva
1.o-AM-S	Medium mit Zusatz von 1% Rinderserumalbumin (Cohnfraktion V) von Serva
2.o-AM-S	Medium mit 2% Rinderserumalbumin (Cohnfraktion V) von Serva
2.o-AM-R	Medium mit 2% Rinderserumalbumin (Cohnfraktion V) von Roth
1.o-AM-B	Medium mit 1%Rinderserumalbumin reinst von Behring
Anson-Einheit	Freisetzung von 1µMol Tyrosin pro min bei 37°C, pH: 2.o aus Hämoglobin bei 28o nm
CDP	Cytidin-5'-Diphosphat
CL	Cycloleucin (1-Aminocyclopentan-1-carboxylat)
cpm	Counts/Minute
2-DG	2-Desoxyglucose
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
Hepes	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
HSA	Humanserumalbumin
ICP	Impulscytophotometer
Ipm	Impulse/Minute
Ileu	Isoleucin
KS	Kalbsserum
Kunitz	Aktivität, die innerhalb 1 min einen Absorptionsabfall hervorruft, der einem 1oo%igen Abbau von RNA gleichkommt.
Leu	Leucin
LDH	Laktatdehydrogenase
MES	Morpholinoäthansulfonsäure
Met	Methionin
MOPS	N-Morpholino-3-propansulfonsäure
NM	Normalmedium
$NADH_2$	Nicotinamid-adenin-dinucleotid

PCA	Perchlorsäure
Phe	Phenylalanin
PPO	2,5-Diphenyloxazol
PS	Pferdeserum
R_{11}	Szintillator von Roth zur Auszählung von nichtwässrigen Proben
R_{22}	Szintillator von Roth zur Auszählung von wässrigen Proben
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RSA	Rinderserumalbumin
SAFM	Serum- und albuminfreies Medium
TCA	Trichloressigsäure
Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

Untersuchungen an tierischen Zellen in serumhaltigen Kulturmedien werfen generell das Problem auf, daß durch das Serum die chemische Zusammensetzung des Kulturmediums nicht exakt definiert ist, da Serum, gleich welcher Herkunft, eine außerordentlich komplexe Zusammensetzung besitzt, die auch noch den individuellen Schwankungen des Spenders unterliegt. Damit sind zahlreiche Aussagen, die sich auf die Proliferationsraten und Stoffwechselleistungen von in vitro kultivierten tierischen Zellen beziehen, mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, die häufig die Ursache widersprüchlicher Befunde der Literatur sind. Darüberhinaus gibt es Fragestellungen, die sich in serumhaltigen Medien gar nicht bearbeiten lassen, z.B.solche aus dem Bereich der Immunologie und Virologie (Tribble 1963) sowie Untersuchungen über den Einfluß von Hormonen, Enzymen und Pharmaka auf Säugerzellen (Nagle und Mit.1963).

Bereits Karzel und Mit., die als einer der ersten Wachstumsversuche an EAT-Zellen in Suspensionskultur durchführten, wiesen auf die komplexe Zusammensetzung des im Medium enthaltenen Pferdeserums hin und machten dessen unterschiedlichen Gehalt an "biologisch aktiven" Faktoren für das zu beobachtende veränderte Wachstumsverhalten der Zellen bei Verwendung verschiedener Serumchargen verantwortlich.

Das Ziel aller Bemühungen um ein chemisch definiertes Kulturmedium ist daher der Ersatz des Serums durch gleichwertige Komponenten bekannter Zusammensetzung und Struktur. Von diesen Komponenten hat das Albumin als Haupteiweißkomponente aller Seren bisher die meiste Aufmerksamkeit beansprucht (Spieker-Polet, Polet 1976).

Im Rahmen von Untersuchungen über Beziehungen zwischen Energiestoffwechsel und Zellproliferation von in vitro in Suspensionskultur züchtbaren Ehrlich Ascites Tumorzellen stellte sich die Frage, ob diese Zellen, die normalerweise in Gegenwart von Pferdeserum optimales Wachstum zeigen, wenigstens für eine begrenzte Zeit in einem chemisch definierten Medium kultiviert werden können.

Ein Thema der vorliegenden Arbeit ist daher das Studium von Wachstum, Vermehrung und einer Reihe von Stoffwechselparametern von in vitro züchtbaren EAT-Zellen in albuminhaltigen Medien mit dem Ziel, diese Zellen in einem serumfreien, albuminhaltigen Medium zu züchten und damit Untersuchungen zu ermöglichen, die man in serumhaltigem Medium nicht durchführen kann.

2. Material und Methoden

Bei den verwendeten Reagenzien handelt es sich, wenn weitere Angaben fehlen, um Chemikalien "pro analysi" oder "für biochemische Zwecke" der Firmen Merck, Darmstadt, Serva, Heidelberg und Roth, Karlsruhe. Biochemikalien wurden von den Firmen Boehringer, Mannheim und Sigma, München, Radiochemikalien von Amersham, Braunschweig und Schwarz/Mann, Heidelberg bezogen.

2.1 Zellmaterial

Alle Experimente wurden mit hyperdiploiden, permanent in vitro züchtbaren Ehrlich-Ascites Tumorzellen in Suspensionskultur nach Karzel u.Mit.(1968) durchgeführt.

2.2 Zellzucht in vivo und in vitro

Die Tumorzellen wurden in der Bauchhöhle weiblicher NMRI-Mäuse (2o - 25 g; Versuchsanstalt Ivanovas, Kisslegg) an- und weitergezüchtet. Dazu wurden jeweils o.2 ml eines ca. 9 Tage alten nativen Ascites einer gesunden Maus intraperitoneal injiziert. Um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurden für alle Untersuchungen die Zellen 13 - 15 Stunden in einem sterilen Kulturmedium bei 37°C angezüchtet. Alle Messungen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, nach einem Mediumwechsel, also während der 2.Passage in vitro (dieses entspricht der I.Passage in Albumin), wobei zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen wurden. Bei Langzeitversuchen erfolgte alle 24 Stunden ein Mediumwechsel, wobei die jeweiligen Anfangsdichten bei 6.8×10^5 Zellen/ml lagen.

2.2.1 Kulturmedien

Wachstumsversuche und Stoffwechseluntersuchungen von Ehrlich-Ascites Tumorzellen erfolgten in folgenden Kulturmedien.

1) Vollmedium (Normalmedium)

Dieses Kulturmedium (= modifiziertes Eaglemedium) entspricht

in seiner Zusammensetzung den Angaben von Schindler (1959) und Krause (1973). Es enthält 15 % Pferdeserum. Aufgrund seiner begrenzten Haltbarkeit (ca. 14 Tage bei + 4°C) wurde es bei Bedarf aus sterilen Vorratslösungen hergestellt und über Membranfilter (Gelman: Metricel, Porengröße o.2 µm) sterilfiltriert.

Dieses Normalmedium diente bei allen Versuchen zur Anzucht der Zellen in der 1.Passage in vitro. In allen folgenden Passagen wurden Zellen in diesem Medium,als Kontrolle bezeichnet, mitgeführt.

Aus Sterilitätsgründen mußte im Verlauf dieser Arbeit Penicillin durch 575 mg Microcillin (Bayer)/1 Medium ersetzt werden. Eine dadurch bedingte Änderung im Zellwachstum wurde nicht festgestellt.

2) Medium mit dialysiertem Pferdeserum

Dieses Medium unterscheidet sich von NM durch die Dialyse des Serums. 3oo ml Serum wurden über 72 Stunden bei dreimaligem Wechsel des Außendialysats (2.5 1) bei 4°C gegen o.9%-ige NaCl-Lösung dialysiert (Visking Dialysierschlauch 36/32).

3) Medium mit 1o% Kalbsserum

Dieses Medium enthält statt des üblichen Pferdeserums 1o% Kalbsserum (Gibco-Biocult).

4) Serum- und albuminfreies Medium (SAFM)

Es setzt sich aus den gleichen Komponenten zusammen wie das NM mit Ausnahme des Serums.

5) Serumfreies Medium mit Albumin

Zur Herstellung des Albuminmediums wurde pulverisiertes oder lyophilisiertes Rinder- oder Humanserumalbumin in unterschiedlichen Konzentrationen in serumfreiem Medium gelöst und anschließend sterilfiltriert.

Allen Albuminmedien wurde, aufgrund eines starken pH-Abfalls in den Kulturen nach 24 Stunden, bereits vor der Sterilfiltration 2o mM Hepes pH 7.5 zugesetzt.

6) Serumfreies Medium mit Zusatz von dialysierten Albuminen

Zur Herstellung dieses Mediums wurden 4 g der jeweiligen Albumine in 4O ml aqua bidest.gelöst und über 72 Stunden bei dreimaligem Wechsel des Außendialysats (1ooo ml) bei 4°C gegen aqua bidest. dialysiert (Visking Dialysierschlauch 2O/32).

7) Glucosefreies Medium

Bei NM wurde das verwendete Serum durch trägergebundene Glucoseoxidase von Glucose befreit.

8) Medien mit verschiedenen pH-Werten

Die Puffersubstanzen (MES, HEPES, MOPS) wurden dem Medium in einer Endkonzentration von 2o mM zugesetzt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte bei 37°C.

9) Medien mit verschiedenen Zusätzen

Zusätze wie Polyamine, Insulin, Ascorbinsäure, Cobalamin, EDTA etc. wurden aus sterilen Vorratslösungen oder frisch angesetzt dem Kulturmedium einige Minuten vor Zugabe der Zellen zugefügt. Die Kontrollkulturen erhielten das gleiche Volumen steriler Hanks-Lösung.

2.2.2 Ansetzen der Kulturen

Am 5. - 7. Tag nach Inokulation der Tumorzellen wurden nach Tötung der Maus 1.O - 1.5 ml der Asciteszellsuspension mit

einer Spritze abpunktiert und möglichst schnell zum Waschen der Zellen in 100 - 150 ml Normalmedium von 37°C aufgenommen. Nach der sterilen Entnahme von 1 ml Zellsuspension zur Bestimmung der Zelldichte wurden die Zellen abzentrifugiert (3 min bei 550 g), der Mediumüberstand bis auf wenige Tropfen abgegossen, die Zellen in 1o ml Waschmedium aufgenommen und ein Aliquot zu 100 ml angewärmtem Medium zugegeben, so daß eine Zelldichte von 6 - 7 x 10^5 Zellen/ml erreicht wurde.

Nach 13 - 15 Stunden bei 37°C im Brutschrank wurde die Zelldichte der Kultur bestimmt, die Zellen wurden abzentrifugiert, einmal mit 10 - 15 ml Albuminmedium gewaschen und in serum- und albuminfreiem Medium aufgenommen. Danach erfolgte die Verteilung der Zellsuspension auf mehrere parallel geführte Kulturflaschen mit frischen, aber unterschiedlichen Medien.

Sollten die Zellen auf Medien unterschiedlichen pH-Wertes verteilt werden, so wurde sowohl zum Waschen wie zum Aufnehmen der Zellen bereits das entsprechende Kulturmedium verwendet. Beim Umsetzen der Kulturen in Langzeitversuchen (4 Passagen) wurden jeweils Parallelkulturen zusammen abzentrifugiert und auf das entsprechende frische Medium verteilt.

Mit jeder weiteren Passage trat, bedingt durch das Umsetzen der Zellen eine zeitliche Verzögerung von 10 bis 20 Minuten ein, die von dem Zeitraum bis zur ersten Probenahme abgezogen wurde. Als Ausgangswert jeder weiteren Passage wurde der 24-Stunden-Wert der vorhergehenden betrachtet.

2.2.3 Bestimmung der Zelldichte

Zwei Verfahren wurden zur Bestimmung der Zelldichte angewandt:

a) Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer

Diese mikroskopische Zellzählung liefert nur dann genaue und reproduzierbare Ergebnisse, wenn bis zu 1ooo Zellen ausgezählt werden. Eine einmalige Auszählung ist daher mit großer

Unsicherheit verbunden und mit einem Fehler bis zu ± 1o% behaftet. Die mikroskopische Zellzahlbestimmung wurde nur zur Erstellung einer Eichkurve für die Trübungsmessung verwendet.

b) Trübungsmessung

Die von Wurster (1970) eingehend untersuchte Trübungsmessung erwies sich als einfache, schnelle und relativ genaue Methode zur Bestimmung der Zelldichte. Danach besteht eine lineare Beziehung zwischen der mit der Zählkammer ermittelten Zelldichte und der Extinktion bei 578 nm im Bereich von ΔE bis o,65o. Zur Messung wurde im Eppendorf Photometer (Photozelle 90 s, Spalt 2.5 x 12, Halbmikroküvetten) bei 578 nm die Extinktion einer homogenen Zellsuspension gegen einen Mediumleerwert gemessen.

Einer Extinktion von o.15o wurde nach Auszählen von Zellen in NM und Albuminmedium zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur eine mittlere Zellzahl von 3.4×10^5 Zellen/ml zugrunde gelegt.

2.2.4 Bestimmung von Vitalität und Totzahl der Zellen

Der Anteil toter Zellen wurde nach der Nigrosin-Methode von Kaltenbach (1958) bestimmt. Als kolloidaler Farbstoff dringt Nigrosin nur dann in die Zelle ein, wenn die Membran defekt ist. Angefärbte Zellen gelten als tot.

o.5 - 1.0 ml Zellsuspension wurden mit kalter Hanks-Lösung auf 10 ml aufgefüllt, die Zellen wurden 10 sec bei 550 g abzentrifugiert und in o.5 ml o.5%iger Nigrosin-Ringerlösung suspendiert. Nach 5 Minuten wurden die Zellen in der NEUBAUER-Zählkammer ausgezählt.

Zur weiteren Überprüfung der Vitalität wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase im Mediumüberstand gemessen. Dieses Enzym kann nur bei geschädigter Zellmembran in das Kulturmedium gelangen.

Die Messung erfolgte mit Hilfe des optischen Tests, wobei die Abnahme der Extinktion von $NADH_2$ bei 366 nm (Eppendorf, Spalt 7 x 12) registriert wurde.

Reagenzien: Natriumpyruvat (11,95 mg/5 ml aqua bidest)
$NADH_2$-Lösung (7,2 mg/ml Phosphatpuffer pH: 7.5)

Testansatz: 2 ml Kulturüberstand
o.1 ml Pyruvat-Lösung
o.o5 ml $NADH_2$-Lösung

Durchführung:

5 ml Zellsuspension wurden 2 min bei 55O g abzentrifugiert, der Überstand wurde erneut zentrifugiert (5 min, 2ooo g) und 2.O ml wurden für die Messung entnommen.

Zur Bestimmung der gesamten Enzymaktivität in Zellen und Medium wurden 2.5 ml Zellsuspension für 5 min in Eis aufbewahrt, 2 x 15 sec bei Stufe 2 (Branson Sonifier, Mikrospitze) beschallt, 1o min bei 2ooo g abzentrifugiert und 2 ml für die Messung eingesetzt.

2.3 Messung von Glykolyse und Atmung

Die Bestimmung der D-Glucose erfolgte mit der Biochemika Testkombination der Fa.Boehringer. L-Laktat wurde nach den Angaben von Bergmeyer (197o) gemessen. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen wurde amperometrisch mit einer teflonbespannten Platinelektrode nach Clark (1953) festgestellt.

2.4 Messung des Proteingehalts, der DNA- und RNA-Synthese

2.4.1 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Wolf (1974).

Reagenzien: 5 mg Amidoschwarz 10 B
5 g $HgCl_2$ (Sublimat)
5 ml Eisessig
Diese Komponenten wurden in 1oo ml aqua bidest. angesetzt und vor Gebrauch filtriert. Als Proteinstandard diente RSA reinst (Behring).

Durchführung:

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden die mit Hanks gewaschenen Zellen in 3 ml aqua bidest aufgenommen und beschallt (Stufe 2,2 x 10 sec, Branson Sonifier). Danach wurde 1 ml der Probenflüssigkeit mit 2 ml Reaktionslösung versetzt, gut durchmischt (10 sec gewhirlt), für 15 min in ein kochendes Wasserbad gestellt und nach Abkühlen 10 min bei 2ooo g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 546 nm gegen destilliertes Wasser gemessen.

2.4.2 Einbau von L- U-^{14}C-Lysin und L-U-^{14}C-Leucin

Reagenzien: L- U-^{14}C Lysin spez.Akt. 287 m Ci/mMol
L- U-^{14}C Leucin " " 330 - 348 m Ci/mMol
(beide Aminosäuren verdünnt auf 2 uCi/ml)
TCA 5 und 1 % ig,
R 11

Durchführung:

1.0 ml Zellsuspension wurde 3 min vorgewärmt und nach Zugabe von o.1 ml ^{14}C-Lysin oder ^{14}C-Leucin unter Schütteln 20 min inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit eiskalter Hanks-Lsg. wurden die Zellen noch 2x mit Hanks-Lsg.gewaschen und im letzten Tropfen der Waschlösung suspendiert eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben mit 2 ml 5%iger TCA versetzt und nach 30 min abzentrifugiert (10 min bei 2ooo g). Der in der TCA suspendierte Niederschlag wurde über Membranfilter (Millipor, Porendurchmesser o.45 µm) abgesaugt. Die

Filter wurden je 1 x mit 5 und 1%iger TCA gewaschen, eine Stunde bei 50°C getrocknet und nach dem Abkühlen in 5 ml R 11 ausgezählt.

2.4.3 Einbau von 2- ^{14}C-Thymidin und 2- ^{14}C-Uridin

Reagenzien: 2- ^{14}C-Thymidin spez.Akt. 53 - 61 mCi/mMol
2- ^{14}C-Uridin spez.Akt. 6o mCi/mMol
(Beide Substanzen wurden mit 10 mM Hepes pH 7.5 auf 2 µCi/ml verdünnt)
TCA 5 % und 1 %
R 11

Durchführung:

Die Durchführung der Messung erfolgte analog dem Einbau von markiertem Lysin und Leucin. Zu 1.o ml Zellsuspension wurden o.o5 ml Thymidin oder Uridin hinzugefügt.

2.5 Messung verschiedener Transportparameter

2.5.1 Aufnahme von 2- ^{14}C-Aminoisobuttersäure und ^{14}C-Cycloleucin

Zur Messung des Na-abhängigen Transports von neutralen Aminosäuren über das A-System wurde 2- ^{14}C-Aminoisobuttersäure, zur Messung des Na-unabhängigen L-System ^{14}C-Cycloleucin verwendet (Christensen u.Mit.1973). Die Aufnahme in den säurelöslichen Pool reflektiert die Transportrate, obwohl geringe Mengen auch in der säureunlöslichen Fraktion erscheinen.

Reagenzien: 2- ^{14}C-Aminoisobuttersäure spez.Akt. 51 mCi/mMol
1- Aminocyclopentan-1-^{14}C-Carboxylat
spez.Akt. 6o mCi/mMol
(verdünnt auf 2 µCi/ml)
TCA
Hanks-Lösung mit und ohne Cycloleucin
(1 mM Endkonzentration)
R 22

Durchführung:

1 ml Zellsuspension wurde 3 min auf 37°C vorgewärmt und nach Zugabe von o.1 ml AIB oder CL unter Schütteln 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 ml eiskalter Hanks- bzw. Hanks-CL-Lösung abgestoppt und nochmals mit der gleichen Menge Hanks gewaschen. Die Waschlösung wurde vollständig abgegossen. Zur Freisetzung der aufgenommenen Aminosäuren wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml 5%iger TCA zerstört. Nach 3o min im Eisbad wurden die Proben 1o min bei 2ooo g zentrifugiert. o.5 ml des Überstands wurden in 1o ml R 22 im Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard - Tri - Carb Modell 3oo3) ausgezählt.

2.5.2 Aufnahme von 2-Desoxy-D- 1 ^{3}H-Glucose

Reagenzien: 2-Desoxy-D- 1-^{3}H-Glucose spez.Akt. 51 mCi/mMol
Hanks-Lösung mit 100 mM Glucose
TCA 10 %
R 22

Durchführung:

1 ml Zellsuspension wurden jeder Kultur entnommen und mit 1o ml des entsprechenden glucosefreien Mediums 1 x gewaschen und bei 37°C abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 1 ml NM bzw. AM mit 2.5 x 10^{-4}M D-Glucose und o.5 µCi Desoxyglucose aufgenommen, 1o min schüttelnd inkubiert, 2 x mit Hanks-Glucose gewaschen und mit 1o%iger TCA extrahiert. Anschließend wurden o.5 ml in 1o ml R 22 ausgezählt.

2.5.3 Aufnahme von Methyl-^{3}H-Cholin

Die Aufnahme von Methyl-^{3}H-Cholin wurde a) kurzzeitig über 1o min am Ende der 2.Passage in vitro und b) durch 2o-minütige Pulsmarkierung zu verschiedenen Zeitpunkten einer Passage gemessen.

Reagenzien: Methyl -^{3}H-Cholin spez.Akt. 8.4 - 1o.1 Ci/mMol
(verdünnt auf 50 µCi/ml)
Hanks-100 mM Cholinchlorid
10 mM Cholinchlorid in aqua bidest.

Durchführung:

a) Zur Erstellung einer Aufnahmekinetik von Methyl-^{3}H-Cholin wurden 10 ml Zellsuspension mit 0.1 ml kaltem Cholinchlorid (Endkonzentration in der Zellsuspension 100 µM) und 10 µCi ^{3}H-Cholin schüttelnd inkubiert. Alle 3o sec wurden o.5 ml Zellsuspension entnommen, über Glasfaserfilter (Gelman Typ A-E) abgesaugt und 2 x mit 10 ml Hanks-Cholinchlorid gewaschen. Die 1 h bei 50°C getrockneten Filterpapiere wurden in R 11 ausgezählt.
b) 1 ml Zellsuspension wurde mit 1 µCi ^{3}H-Cholin (= 0.1 mMol ^{3}H-Cholin; 1 : 10 verdünnt mit kaltem Cholinchlorid) 10 min schüttelnd bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion geschah analog zu a).

2.6 Bestimmung des Lipidgehaltes und der Lipidsynthese

2.6.1 Gravimetrische Messung der Gesamtlipide

Die Extraktion der Gesamtlipide erfolgte nach Folch u.Mit. (1957) mit folgender Abwandlung.

Reagenzien: PCA o.6 N
Chloroform: Methanol 1 : 1
2 mM $CaCl_2$-Lösung

Durchführung:

Eine definierte Zellzahl wurde aus dem Medium abzentrifugiert, 2 x mit Hanks gewaschen und das Protein mit 3 ml o.6 N PCA gefällt. (Bei Inkubation der Zellen mit radioaktiv markierten

Lipidvorstufen wurde der PCA - Überstand zur Bestimmung der in der säurelöslichen Fraktion enthaltenen Radioaktivität aufbewahrt). Das Sediment wurde mit 5 ml Chloroform : Methanol bei 70°C 3 min unter Rückfluß extrahiert. Dem abgekühlten Gemisch wurden 10 ml $CaCl_2$-Lösung zugesetzt, gut durchmischt und 10 min bei 2000 g abzentrifugiert. Danach wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgesaugt und die Chloroformphase nochmals mit $CaCl_2$ gewaschen. Nach dem Zentrifugieren wurde die Chloroformphase vorsichtig von unten abgetrennt und 5 x je 0.2 ml des Extraktes wurden nach Eindampfen bei 70°C auf der Cahnwaage (Cahn Instrument Company, California, Model1 G) abgewogen.

2.6.2 Messung der Lipidsynthese mittels radioaktiver Vorstufen

Die Messung der Gesamtlipidsynthese erfolgte mit ^{3}H-Acetat, die der Phospholipidsynthese mit den markierten Vorstufen Cholin und Äthanolamin.

Reagenzien:
- ^{3}H-Acetat (verdünnt auf 200 µCi/ml) spez.Akt. 0.75 Ci/mMol
- Methyl ^{3}H-Cholin (verdünnt auf 50 µCi/ml) spez.Akt. 8.4 - 10.1 Ci/mMol
- Methyl ^{14}C-Cholin (verdünnt auf 10 µCi/ml) spez.Akt. 52 mCi/mMol
- 2-^{14}C Äthanolamin (verdünnt auf 10 µCi/ml) spez.Akt. 50 mCi/mMol
- K_3PO_4 (40.3 g + 40 ml H_2O)
- R 11 und R 22

Durchführung:

Einer 25 ml Zellkultur mit einer definierten Zellzahl wurden 100 µCi Acetat, 12 µCi ^{3}H-Cholin, 2 µ Ci ^{14}C-Cholin oder 2 µCi ^{14}C-Äthanolamin hinzugefügt und 20 min bei 37°C bei kontinuierlicher Bewegung der Kulturflaschen (Drehschrank: 1 U / 2.5 min) inkubiert. Die Endkonzentration des jeweils

entsprechenden kalten Substrats betrug bei Acetat 200 uM, bei Cholin und Äthanolamin 100 uM. Die Reaktion wurde durch Einstellen der Kulturflaschen für 10 min in ein Eisbad unterbrochen. Je 1 ml wurde für die Bestimmung der Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion entnommen. Die restliche Zellsuspension wurde analog zu 2.6.1 extrahiert.

Zur Bestimmung der Totalaktivität in den einzelnen Proben wurden 2 x je o.1 ml Chloroformextrakt entnommen, eingedampft und in 5 mlR 11 ausgezählt.

Die Radioaktivität in der säurelöslichen Fraktion erhielt man, indem je 1.o ml PCA-Überstand mit K_3PO_4 neutralisiert, für 10 min ins Eis gestellt und anschließend zentrifugiert wurde. Je o.5 ml des Überstands wurde in 1o ml R 22 ausgezählt.

2.6.3 Chromatographische Trennung der Gesamtlipide

Die Charakterisierung der markierten Lipide geschah dünnschichtchromatographisch mit Hilfe eines im Labor üblichen Drei-Kammer-Trennsystems.

Plattenmaterial: 1. DC-Kieselgel 60 (ohne Fluoreszensindikator)
Schichtdicke o.25 mm (Merck)
2. DC-Karten SI, Kieselgel auf Aluminiumkarten
Schichtdicke o.2 mm (Riedel de Haen)

Trennsystem: I Chloroform/Methanol/H_2O (75:25:4)
II Chloroform
III n-Hexan

Waschlösung: Chloroform/Benzol (3:2)

Nachweisreagenzien: 2,7 Dichlorfluoreszein Sprühreagenz o.1%
Molybdatophosphorsäure Sprühreagenz 3.5%

Durchführung:

Ein Aliquot des Lipidextraktes (1.5 ml) wurde unter N_2 auf o.2 - o.3 ml eingeengt und auf die gewaschenen und aktivierten Platten (1 h bei 120°C) aufgetragen.

In Kammer I betrug die Trennstrecke 3 cm, in Kammer II 1o cm und in Kammer III (bei Kammersättigung) 15 cm. Nach jedem Lauf erfolgte eine Zwischentrocknung unter warmem Luftstrom. Das getrocknete Chromatogramm wurde mit 2,7 Dichlorfluoreszein angesprüht, getrocknet und die fluoreszierenden Flecke unter UV-Licht markiert. Anschließend wurde die Platte mit Molybdatophosphorsäure angesprüht und 2 min bei 12o°C im Trockenschrank entwickelt.

2.6.4 Chromatographische Trennung der Phospholipide

Zur speziellen Trennung von Phospholipiden wurde ein basisches Zwei-Kammer-System verwendet.

Trennsystem: I Aceton/Petroläther 1 : 3
II Chloroform/Methanol/Ammoniak 7o:3o:5

Referenzsubstanzen:
L-α-Phosphatidylcholin
L-α-Phosphatidylcholindimyristin
Phosphatidylserin
L-α-Phosphatidyläthanolamindipalmitin
L-α-Phosphatidyläthanolamin
Sphingomyelin
Lysophosphatidylcholin

Durchführung:

Laufmittel I holte alle unpolaren Lipide an die Front (14 cm). Laufmittel II trennte die Phospholipide auf einer Trennstrecke von 1o cm.

2.6.5 Identifizierung und Quantifizierung der getrennten Phospholipide

Die Identifizierung der getrennten Lipide auf dem Chromatogramm erfolgte durch den Vergleich der R_f-Werte der markierten Lipide mit denen der entsprechenden Referenzsubstanzen.

Die Quantifizierung der markierten Vorstufen in den Lipiden geschah durch
a) Ausheben der angefärbten Flecke auf dem Chromatogramm
b) Autoradiographie
zu a) Die unter UV-Licht markierten und die mit Molybdatophosphorsäure angefärbten Flecke wurden mit dem Kieselgel von der Platte gekratzt. Es wurde dabei darauf geachtet, daß der durch das Anfärben der Lipide bedingte Quench beim Auszählen der Proben in den untereinander zu vergleichenden Banden gleich groß war. Das geschah durch Ausheben gleich großer Flächen von Banden gleichen R_f-Wertes. Das ausgekratzte Material wurde in 1o ml R 11 ausgezählt.
zu b)

Reagenzien:
- 2.5-Diphenyloxazol in 1o% Äther abs.
- Film: RP/S X-Omat von Kodak
- Entwickler: Dentus D (Agfa)
- Fixierer: Tetenal

Durchführung nach Randerath (197o):

Zur Verstärkung der Strahlungsintensität und zur Verkürzung der Belichtungsdauer wurde das getrocknete, nicht angefärbte Chromatogramm 3 x 3 sec lang in eine Szintillationslösung (PPO) getaucht und anschließend senkrecht getrocknet. Das Einlegen des Films erfolgte in der Dunkelkammer. Nach einer Belichtungsdauer von 5 Tagen bei -8o°C wurden die Photoplatten 3 min in die Entwicklerflüssigkeit gelegt, 5 - 1o min fixiert, unter fließendem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

2.6.6 Cholesterinbestimmung

Die quantitative Bestimmung des Cholesterins erfolgte gaschromatographisch nach der Methode des inneren Standards.

Reagenzien: 5-α-Cholestan
N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluor (o) acetamid (Macherey und Nagel)

Säulenmaterial: 4% SE 52 auf Chromosorph, 80 - 100 mesh
Helium als Trägergas
Temperatur: 260°C
Druck: 51 psi

Durchführung:

Zu der zu bestimmenden Probe wurde eine bekannte Menge an 5-α-Cholestan zugesetzt, mit N-Methyl-N-trimethylsilyl- trifluor (o) acetamid silyliert und 1 µl der Probe in den Gaschromatographen (GC - Varian aerograph) gespritzt. Als Standard diente eine bekannte Menge an Cholesterin.

2.7 Aminosäureanalyse

Reagenzien: PCA 0.6 N
KOH 10 N
Citronensäurelösung, gesättigt
HCl konz.

Durchführung:

Zur Aminosäureanalyse wurden 5 ml frisches Kulturmedium oder Zellüberstand mit o.5 ml 6 N PCA zur Enteiweißung versetzt. Nach 1o-minütigem Stehen im Eisbad wurde gewhirlt und bei 2ooo g abzentrifugiert. Um das Perchlorat auszufällen, füg-te man zu 4.5 ml PCA saurem Überstand 0.350 ml 1o N KOH hinzu. Nach dem Abzentrifugieren wurden 3.5 ml des leicht alkalischen Überstandes mit o.11o ml gesättigter Citronensäurelösung versetzt. Die genaue Einstellung des pH-Wertes er-

folgte durch Zugabe von o.o1 - o.o2 ml konzentrierter HCl.

Die Trennung und quantitative Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mit Hilfe des Aminosäureanalysators (Multichrom B von Beckman).

2.8 Zellzyklusverteilung

Reagenzien:
- NaCl-Lösung
- Äthanol, 96%
- o.1% RNase in aqua bidest
- o.2% Pepsin in o.2% HCl
- Ethidiumbromid (10 µg/ml 50 mM Tris-HCl pH: 7.5)

ICP-Standard:
2.3 pg DNA/Partikel
1 ml heparinisiertes Hühnerblut wird mit 1 ml 2o%iger Essigsäure versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird mit 96%igem Äthanol aufgefüllt. Der Standard ist mehrere Monate im Kühlschrank haltbar. (Angaben von Phywe, Göttingen)

Durchführung nach Schuhmann und Göhde (1974):

Je nach Zelldichte wurden 2 - 3 ml Zellsuspension 2 x mit kalter NaCl gewaschen, 2 min bei 55o g zentrifugiert und in 1o ml Äthanol fixiert. Nach 3o min im Methanolbad von -35°C wurden die Proben zugestopft und bei -2o°C aufbewahrt. Danach wurden alle Proben eines Versuches mit o.9%-iger NaCl gewaschen und zur Entfernung der RNA mit o.1 ml RNase (1o Kunitzeinheiten) bei 37°C im Wasserbad 1 h lang inkubiert. Die Reaktion wurde durch kalte NaCl abgestoppt. Das abzentrifugierte Sediment wurde, um das Cytoplasma zu entfernen, mit o.2 ml Pepsin (12 Ansoneinheiten) versetzt und erneut für 15 min bei 37°C ins Wasserbad gestellt. Nach Abstoppen dieser Reaktion mit NaCl und Zentrifugation wurde die DNA mit 5 ml Ethidiumbromid angefärbt.

2.9 Darstellung und Fehlerbreite der Ergebnisse

Alle gemessenen Stoffwechselgrößen in den verschiedenen Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, in % der entsprechenden Werte von 10^6 Zellen der Kontrolle (NM) ausgedrückt und erlauben somit eine Aussage über den Einfluß der Medienzusammensetzung auf die Stoffwechselleistungen der in diesem Medium wachsenden Zellen. Da diese prozentualen Angaben aber keinen Einblick in die innerhalb einer Passage sich ändernden Stoffwechselaktivitäten in NM und AM geben, wurden bei den Einbaustudien mitunter auch die Absolutwerte aufgeführt. Die Höhe dieser Werte konnte in den einzelnen Versuchen, vor allem wenn sie in längeren zeitlichen Abständen durchgeführt wurden, bei gleichbleibender Tendenz größeren Schwankungen unterliegen. Die prozentualen Angaben hingegen veränderten sich nur wenig. Aufgrund dieser Beobachtung schien es möglich, bei der Aufzeichnung der Absolutwerte 2-3 charakteristische Versuche herauszugreifen, bei der Angabe der Relativwerte aber die gesamten Versuche miteinzubeziehen. Als Ursache für die Schwankungen der Absolut- und Relativwerte können u.a. jahreszeitliche Wachstumsschwankungen der Zellen oder Wechsel der Serumcharge (3x während dieser Arbeit) mit verantwortlich sein. Um die biologische Schwankungsbreite so gering wie möglich zu halten, wurden bei der Zusammenfassung der Ergebnisse immer nur diejenigen Experimente berücksichtigt, die etwa im gleichen Zeitraum und mit gleicher Serumcharge durchgeführt wurden.

Statistische Signifikanzberechnungen wurden, wegen zu großer Schwankungen der Absolutwerte nicht durchgeführt. Es schien sinnvoller, eine möglichst große Anzahl an Parametern zu messen, um Tendenzen aufzeigen zu können.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluß verschiedener Albuminmedien auf Zellwachstum und Stoffwechselaktivitäten von EAT-Zellen

Zur Klärung der Frage, welche Albuminspecies, -chargen und -konzentrationen hinsichtlich ihrer Wirkung auf Wachstum und Vermehrung von EAT-Zellen in vitro der des Serums am nächsten kommen, wurde eine Reihe von Stoffwechselparametern in folgenden Albuminmedien untersucht:

- in o.5, 1.o und 2.o %igem RSA-Medium (Cohnfraktion V) von Serva (= o.5-AM-S, 1.O-AM-S, 2.O-AM-S)
- in 2 %igem RSA-Medium (Cohnfraktion V) von Roth (= 2-AM-R)
- in 1 %igem RSA-Medium, rein Charge 1o31 von Behring[1)]
- in 1 %igem RSA-Medium, reinst Charge 743 von Behring[1)] (= 1-AM-B)
- in 1 %igem HSA-Medium, Chargen 2o31, 2o34, 2o38 und 2o4o von Behring[1)]

3.1.1. Einfluß der Cohnfraktion V und des reinsten Rinderserumalbumins auf Zellwachstum und Stoffwechselaktivitäten von EAT-Zellen

EAT-Zellen zeigten in 1-AM-S die besten Wachstumsraten, in 1-AM-B bei nicht bestimmbarer Vermehrungsrate, die höchsten Einbauraten für markiertes Thymidin, Uridin, Leucin und Lysin. Die Vermehrungsrate der Zellen in 1-AM-S betrug 38%, die der Kontrolle 79%, bei einer gleichzeitigen Proteinzunahme von durchschnittlich 52% bzw. 97% innerhalb von 24 Stunden.

Glykolyserate und Atmung der Zellen in NM und 1-AM-S zeigten keine signifikanten Unterschiede (s. Tabelle 1).

[1)] Wir danken den BEHRINGWERKEN, Marburg, für die freundliche Überlassung der Albuminfraktionen.

Der Anteil toter Zellen am Ende der 2.Passage in vitro betrug in den beiden Albuminmedien 1-AM-S und 1-AM-B 3%, in NM 2%.

Tabelle 1: Laktatproduktion und Glucoseverbrauch von EAT-Zellen in NM und 1-AM-S während der 2.Passage in vitro.

Medium	Laktatproduktion uMol/10^6 Z		Glucoseverbrauch uMol/10^6 Z		Laktat/Glucose Quotient
Zeit (h)	0 - 6	6 - 12	0 - 6	0 - 12	0 - 12
Normal-medium	0.696 ±0.125	0.765 ±0.135	0.581 ±0.073	0.608 ±0.126	1.23
Mittelwerte	0.730 ± 0.133 (n=30)		0.592 ± 0.098 (n=30)		
1-AM-S	0.693 ±0.148	0.748 ±0.176	0.666 ±0.124	0.449 ±0.070	1.27
Mittelwerte	0.710 ± 0.160 (n=8)		0.557 ± 0.153 (n=8)		

Die Vermehrungsrate in 1-AM-B konnte aufgrund eines bereits nach 2 - 4 Stunden auftretenden Haftens der Zellen am Glas nicht ermittelt werden. Im Gegensatz dazu konnte ein gelegentlich zu beobachtendes Anhaften der Zellen am Glas in 1-AM-S durch kräftiges Schütteln der Kulturflaschen beseitigt und zumindest makroskopisch bis Kulturende nicht mehr beobachtet werden. Aufgrund dieser Schwierigkeit bei der Ermittlung der Zellvermehrung, die nahezu in allen Albuminmedien auftrat, wurden zum Vergleich der verschiedenen Albuminmedien vorwiegend Einbaustudien herangezogen. Bei diesen Untersuchungen erfolgte die Umrechnung der gemessenen Einbauraten auf die im Inkubationsgefäß und nicht auf die in der Kulturflasche ermittelte Zellzahl.

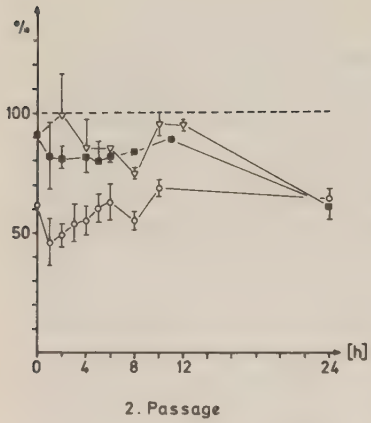


Abb.1: Aufnahme von AIB in EAT-Zellen (n = 4)

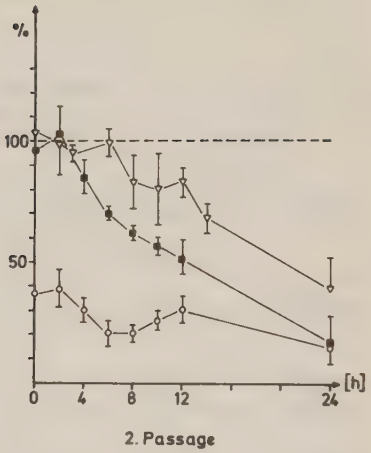


Abb.2: Einbau von Thymidin in EAT-Zellen (n = 6)

in verschiedenen Albuminmedien und in serum- und albuminfreiem Medium. ■-■ 1-AM-S; ▽-▽ 1-AM-B; o - o SAFM (Relativwerte bezogen auf die Kontrollen = 100 %).

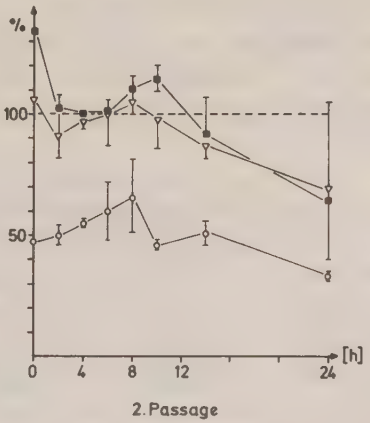
Wie aus Abb.1 hervorgeht, war der Transport von 2-Aminoisobuttersäure in die Zellen in 1-AM-B und 1-AM-S in den ersten 12 Stunden gegenüber der Kontrolle nur wenig beeinträchtigt. Erst in der 2.Hälfte der Passage fiel er in beiden Medien auf nahezu 6o% ab. Dabei lagen die durchschnittlich gemessenen Transportraten der Zellen in 1-AM-B bis zu 15 % höher als in 1-AM-S.

Gegenüber der AIB-Aufnahme war der Transport von ^{14}C-Cycloleucin in die Zellen in 1-AM-S unerwartet hoch (s.3.4 Abb.21).

Abgesehen vom Beginn der Kultur lag die Aufnahmerate des Cycloleucins über einen Inkubationszeitraum von 24 Stunden bis um 57 % höher als in NM. Ein deutlicher Unterschied von 2o - 3o % bestand im Thymidineinbau der Zellen in 1-AM-B und 1-AM-S (Abb.2). In 1-AM-S fielen die Einbauraten nach 2-stündiger Kulturdauer kontinuierlich auf 18 % am Ende der Passage ab, während sie in 1-AM-B bis zu 7 Stdn. normal sind und nach 24 Stunden immer noch 4o% der Kontrolle betrugen.

Der Einbau von Uridin wurde von einem Mediumwechsel der Zellen weniger betroffen als der Thymidineinbau (Abb.3). In beiden Albuminmedien war der Einbau von Uridin zu Beginn der Kultur leicht erhöht, fiel danach ab, um nach 6 - 8 Stunden ein Maximum zu erreichen. Nach 24 Stunden lagen die gemessenen Einbauraten mit 65% in 1-AM-S und 7o% in 1-AM-B noch beträchtlich höher als der Thymidineinbau zum gleichen Zeitpunkt und in den gleichen Medien.

Abb.3:
Einbau von Uridin in EAT-Zellen in verschiedenen Albuminmedien und in serum- und albuminfreiem Medium
(Relativwerte bezogen auf die Kontrollen = 100 %)
■-■ 1-AM-S
▽-▽ 1-AM-B
○-○ SAFM
(n=4)



Die prozentualen Einbauraten für Leucin und Lysin zeigten sowohl zwischen den beiden Aminosäuren als auch zwischen den beiden Medien Unterschiede (Abb.4 + 5). Ausgehend von einem, gegenüber der Kontrolle leicht abgefallenen Leucineinbau (85%) in beiden Medien zu Beginn der Kultur, stieg

dieser in 1-AM-B innerhalb der ersten 8 Stunden an und fiel erst in der 2.Hälfte der Passage unter die für Zellen in NM gemessenen Werte; dagegen sank er in 1-AM-S vom Beginn der Kultur kontinuierlich auf 25% nach 24 Stunden ab. Zu diesem Zeitpunkt lag die in 1-AM-B gemessene Leucineinbaurate noch bei 41% der Kontrolle.

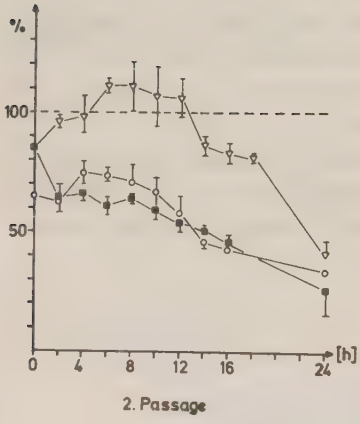


Abb.4: Einbau von Leucin (n = 6)

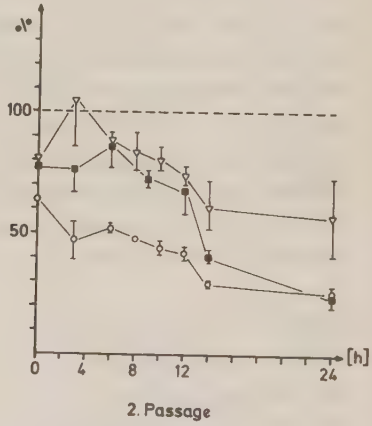


Abb.5: Einbau von Lysin (n = 4)

in EAT-Zellen in verschiedenen Albuminmedien und in serum- und albuminfreiem Medium

■-■ 1 + AM-S

▽-▽ 1 - AM-B

o - o SAFM

(Relativwerte bezogen auf die Kontrolle = 100 %)

Obwohl der Einbau von ^{14}C-Leucin in die säureunlösliche Fraktion der Zellen in 1-AM-S gegenüber der Kontrolle stark erniedrigt war, zeigten die Ergebnisse der Aminosäureanalyse (Tab.2), daß diese Zellen vermehrt Leucin dem Medium entnehmen. Im Verlauf einer 24-stündigen Kultur verbrauchten Zellen in 1-AM-S 35% mehr Leucin als Zellen in NM.

Tabelle 2:
Verbrauch einiger Aminosäuren aus dem Nährmedium von EAT-Zellen in NM und 1-AM-S
Inkubationsdauer: 24 h (2.Passage in vitro)
Ausgangszelldichte: 7.2 x $1o^5$ Z/ml Medium

	Verbrauch in nMol/ml Zellsuspension					Zellvermehrung in % des Ausgangswertes
	Met	Ileu	Leu	Tyr	Phe	
Normalmedium	18±4	17o±1o	166±1o	21±3	23±3	43
1-AM-S	16±1	22o±22	223±25	22±2	23±8	26
% der Kontrolle	89 (n=4)	128 (n=4)	135 (n=4)	1o6 (n=4)	1o6 (n=4)	61 (n=4)

Auch der Lysineinbau war in beiden Medien bereits zu Beginn der Kultur um 2o% niedriger als in NM. Nach vorübergehendem Anstieg auf 1o5% in 1-AM-B und 86% in 1-AM-S fiel er in beiden Albuminmedien ab, wobei der Abfall der Einbauraten, bezogen auf den Ausgangswert, in 1-AM-S mit 7o% doppelt so stark war wie der in 1-AM-B mit 3o%.

Wie aus den Abb.1 - 5 ferner zu entnehmen ist, zeigten Zellen in SAFM im Vergleich zu denen in NM und AM generell und bereits vom Beginn der Kultur eine deutlich herabgesetzte Transportrate für AIB und niedrigere Einbauraten für die markierten Aminosäuren und Nucleoside. Dabei ist die Aufnahme von AIB mit einer Verminderung um 3o% im Verlauf der Kultur am wenigsten, der Thymidineinbau mit einem Abfall von 6o% am stärksten betroffen. Die Wachstumsrate der Zellen in SAFM ließ sich aufgrund eines unmittelbar nach Umsetzen der Zellen auf dieses Medium auftretenden Haftens am Glas nicht feststellen. Kräftiges Schütteln der Kulturflasche führte in diesem Medium zur Koagulation der Zellen. Die herabgesetzte Vitalität der Zellen in SAFM kam

sowohl in einer erhöhten Totzahl wie auch in einem raschen Anstieg der LDH im Kulturüberstand nach Abzentrifugieren der Zellen zum Ausdruck. Bereits 2o - 3o Minuten nach Umsetzen der Kulturen auf dieses Medium konnte eine gegenüber der Kontrolle bis zum 8-fachen erhöhte Aktivität dieses Enzyms in der Kulturflüssigkeit gemessen werden. Dagegen wurden in den Kulturmedien der beiden AM erst nach 1o Stunden gegenüber der Kontrolle leicht erhöhte LDH-Werte gefunden. Die LDH-Aktivität im Medium nahm in der 2.Hälfte der Passage stark zu, obwohl im gleichen Zeitraum der durch Anfärbung mit Nigrosin bestimmte Anteil toter Zellen gegenüber dem in NM nahezu unverändert blieb (Tabelle 3).

Tabelle 3:
LDH-Aktivität im Überstand verschiedener Kulturmedien zu Beginn der Kultur und nach 1o- und 24-stündiger Kulturdauer. Nach Homogenisation setzen $1o^6$ Zellen 51o mU LDH frei.

Zeit	Normalmedium		SAFM	1-AM-S	1-AM-B
h	mU LDH / ml Medium	Anteil toter Zellen %	mU LDH / ml Medium	mU LDH/ ml Medium	mU LDH / ml Medium
0	9 ($o.17x1o^5$ Z) 1)	2.5	74 ($1.45x10^5$)	14 ($o.27x1o^5$ Z)	10 ($o.19x1o^5$ Z)
10	35 ($o.68x1o^5$ Z)	7	112 ($2.3x1o^5$ Z)	40 ($o.78x1o^5$ Z)	47 ($o.92x1o^5$ Z)
24	48 ($o.94x10^5$ Z)	7	153 ($3.0x10^5$ Z)	87 ($1.7x10^5$ Z)	103 ($2.0x1o^5$ Z)

(Gemittelte Werte aus 6 Kulturen)

1) Die in den Klammern angegebenen Werte entsprechen der Zahl an toten Zellen, die LDH freisetzen.
Die Berechnung der LDH-Aktivität erfolgte nach dem Verbrauch von $NADH_2$/min.

3.1.2. Beziehungen zwischen Albuminkonzentration und Wachstum sowie Stoffwechselaktivitäten von EAT-Zellen

Die aus der Literatur bekannte Wachstumsabhängigkeit der Lymphocyten vom Albuminanteil des Mediums (Polet und Polet 1975), veranlaßte uns, einige Stoffwechselgrößen von EAT-Zellen in Medien mit o.5, 1.o und 2.o % Albumin (RSA-Cohnfraktion V Serva) zu messen. Wie die Tabelle 4 zeigt, bestand kein Unterschied zwischen den Vermehrungsraten der Zellen in den Medien verschiedener Albuminkonzentrationen. Der Anteil toter Zellen nach 12 und 24 Stunden war in 1-AM-S und 2-AM-S mit 2 - 3 % gleich hoch, in o.5-AM-S mit durchschnittlich 6.3 % doppelt so hoch. Identisch waren die Laktat/Glucose Quotienten nach 12 Stunden in allen Medien. Sie lagen im Bereich von ± 8% der Kontrolle.

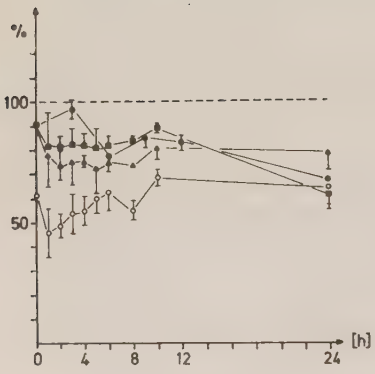
Tabelle 4: Prozentuale Zunahme der Zellzahl von EAT-Zellen in Medien mit verschiedenen Albuminkonzentrationen in der 2.Passage in vitro = 1.Passage in AM.

Zeit (h)	Normalmedium	o.5-AM-S	1.o-AM-S	2.o-AM-S
6	15 ± 5	8 ± 3	7 ± 3	11 ± 8
8	22 ± 8	12 ± 1	13 ± 3	-
10	29 ± 6	2o ± 2	17 ± 3	-
12	33 ± 14	-	-	24 ± 8
24	79 ± 8	35 ± 16	38 ± 10	38 ± 9
	(n = 30)	(n = 4)	(n = 12)	(n = 10)

Die gemessenen Transportraten für AIB zeigten während 1o-stündiger Inkubation in den verschiedenen Medien Schwankungen bis zu 25%, wobei für Zellen in o.5-AM-S mit 7o - 8o% der Kontrolle die niedrigste Transportrate gemessen wurde (Abb.6). Die durchschnittlichen Aufnahmeraten nach 1o Stunden lagen in

allen Medien zwischen 8o - 9o %, nach 24 Stunden zwischen 6o und 8o% der Kontrolle.

Der Thymidineinbau fiel, unabhängig vom Albuminanteil des Mediums, annähernd gleichmäßig auf 5o% nach 12 und 15 - 3o% nach 24 Stunden (Abb.6a)ab.



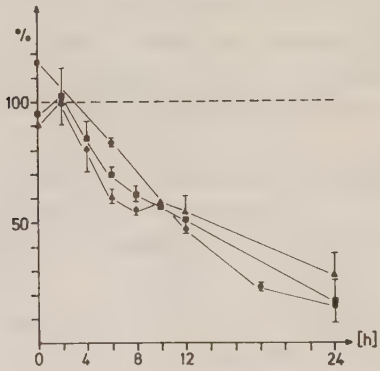


Abb.6:
Einfluß verschiedener Albuminkonzentrationen auf den Aminosäuretransport von EAT-Zellen (n=4). Aufnahme von Aminoisobutters.

o-o SAFM
▲-▲ o.5-AM-S
■-■ 1.o-AM-S
●-● 2.o-AM-S

Abb.6a:
Effekt verschiedener Albuminkonzentrationen auf die DNA-Synthese von EAT-Zellen.
^{14}C-Thymidineinbau in die Zellen (n=6).

▲-▲ o.5-AM-S,
■-■ 1.o-AM-S
●-● 2.o-AM-S

Die Einbauraten für Leucin lagen in 1-AM-S bis zu 15% niedriger als in o.5-AM-S. Nach 12 Stunden betrugen sie in 1-AM-S 5%,

in o.5-AM-S 65%, nach 24 Stunden 26% bzw. 53% der Kontrolle (Abb.7). Die impulscytophotometrisch ermittelten DNA-Histogramme zeigten keinen Unterschied zwischen den einzelnen AM und der Kontrollkultur während der 2.Passage in vitro. Dagegen kann aus dem verzögerten Anstieg des G_2/G_1-Verhältnisses der Zellen bei Serum- und Albuminmangel, sowie aus den stark erniedrigten Einbauraten für markierte Vorstufen auf eine verlangsamte Proliferationsaktivität der Zellen geschlossen werden.

Abb.7:

Einfluß verschiedener Albuminkonzentrationen auf die Proteinsynthese von EAT-Zellen
Einbau von Leucin (n = 4).
(■-■) o.5-AM-S
(▲-▲) 1-AM-S

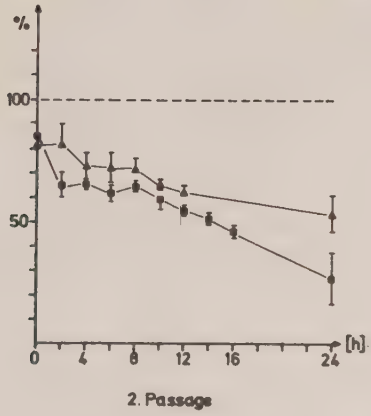


Abb.8: DNA-Histogramme von EAT-Zellen in
a) Normalmedium
b) Serum- und albuminfreiem Medium
bei Kulturbeginn und nach 1o- und 24-stündiger Kulturdauer

Abb.8a:

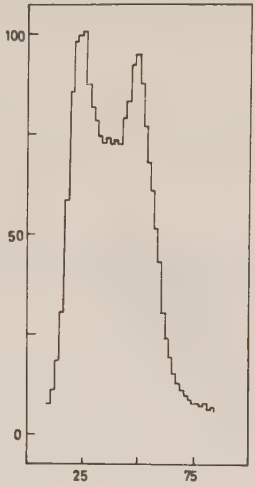
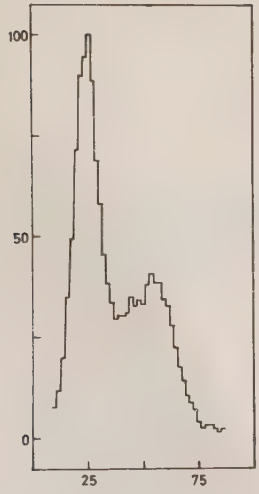
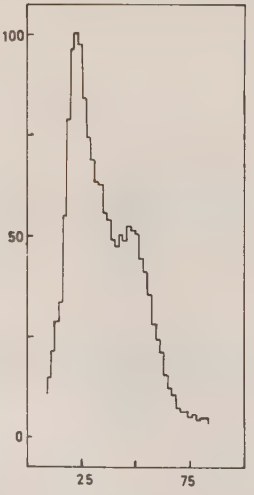
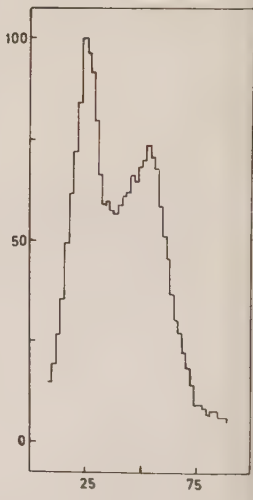


Abb.8b 0 h 1o h 24 h







0 h 1o h 24 h

Die Zellzyklusanalysen[2)] wurden mit einem Impulscytophotometer (ICP) von Phywe, Göttingen durchgeführt. Es mißt die Fluoreszensausbeute fluorochromierter Zellinhaltsstoffe, sortiert und speichert die Einzelimpulse und schreibt die Häufigkeitsverteilung als Histogramm aus.

Dieses Histogramm erlaubt - ohne Rechenprogramm - eine Aussage über den relativen Anteil von G_1 und G_2 + M-Phase der Zellen an der Gesamtpopulation. Der erste Peak des Histogramms repräsentiert die Zellen mit 2c DNA = G_1, der zweite diejenigen mit 4c = G_2. Der Vergleich der Proliferationsgeschwindigkeit von EAT-Zellen wurde als zeitliche Änderung des G_2/G_1-Verhältnisses $\frac{\text{Höhe } G_2\text{-Peak}}{\text{Höhe } G_1\text{-Peak}} \times 100$ angegeben.

Ordinate: Impulse/Kanal (Relativwerte)
Abzisse: Nummer des Kanals (Löffler u.Mit.1978).

3.1.3. Einfluß der Cohnfraktion V verschiedener Herkunft auf das Wachstum von EAT-Zellen

Bei Verwendung der gleichen Albuminfraktion Cohn V betrug die Vermehrungsrate von EAT-Zellen in Medium mit 2% Albumin der Firma Serva durchschnittlich 38%, in Medium mit 2% Albumin der Firma Roth nur 15%. Der Anteil toter Zellen lag bei 3 bzw. 12 %. Über einen Inkubationszeitraum von 9 Stunden produzierten, wie aus Tabelle 5 hervorgeht, Zellen in 2-AM-S dieselbe Laktatmenge wie die Kontrollen, jedoch um 25 - 29 % mehr Laktat bei ebenfalls erhöhtem Glucose-Verbrauch als Zellen in 2-AM-R.

Der molare Laktat/Glucose Quotient nach 9 Stunden war in beiden Medien gleich.

---

2) Herrn Dr.S.Postius danke ich für die Aufnahme der DNA-Histogramme

Tabelle 5: Laktatproduktion, Glucoseverbrauch und molarer Laktat/Glucose Quotient von EAT-Zellen in 2-AM-S und 2-AM-R während der 2.Passage in vitro = 1.Passage in AM

Medium	Laktatproduktion $\mu Mol/1o^6$ Z	Glucoseverbrauch $\mu Mol/1o^6$ Z	Laktat/Glucose Quotient
Normal-medium	o.73o ± o.133 (n=3o)	o.592 ± o.o98 (n=3o)	1.23
2-AM-S	o.728 ± o.o63 (n=4)	o.641 ± o.o86 (n=4)	1.13
2-AM-R	o.566 ± o.o24 (n=4)	o.511 ± o.o33 (n=4)	1.1o

Die gemessenen Transportraten für AIB lagen nach 12 Stunden in 2-AM-R mit 6o% der Kontrolle um 23% niedriger als in 2-AM-S, die 83% der Kontrolle betrugen. (Abb.9).

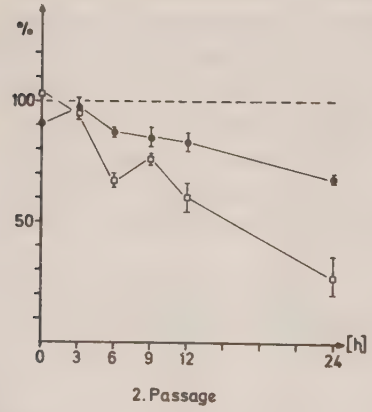


Abb.9:
Einfluß von Cohnfraktionen verschiedener Herkunft auf den Aminosäuretransport. Aufnahme von AIB in die EAT-Zellen in 2-AM-S (● - ●) und 2-AM-R (□ - □) (n=4)

Die DNA-Histogramme zeigten einen gering verzögerten Anstieg des G_2/G_1-Verhältnisses von Zellen in 2-AM-R (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zeitliche Verschiebung des G_2/G_1-Verhältnisses berechnet aus den DNA-Histogrammen von Ehrlich Ascites-Tumor-Zellen in 2-AM-S und 2-AM-R-Kulturen

Medium \ Stdn.	0	3	6	9	12	24 h
2-AM-S	47	37	40	62	81	76
2-AM-R	45	31	31	52	66	70

Obwohl die verwendeten Rinderserumalbumine die Vermehrung und den Stoffwechsel von EAT-Zellen in unterschiedlichem Maße beeinflußten, konnten zwischen den beiden Cohnfraktionen von Serva und Roth und auch reinstem RSA von Behring isotachophoretisch keine groben qualitativen Unterschiede festgestellt werden (Abb.1o), wohl aber feinere quantitative, deren Bedeutung zunächst nicht interpretierbar ist[3].

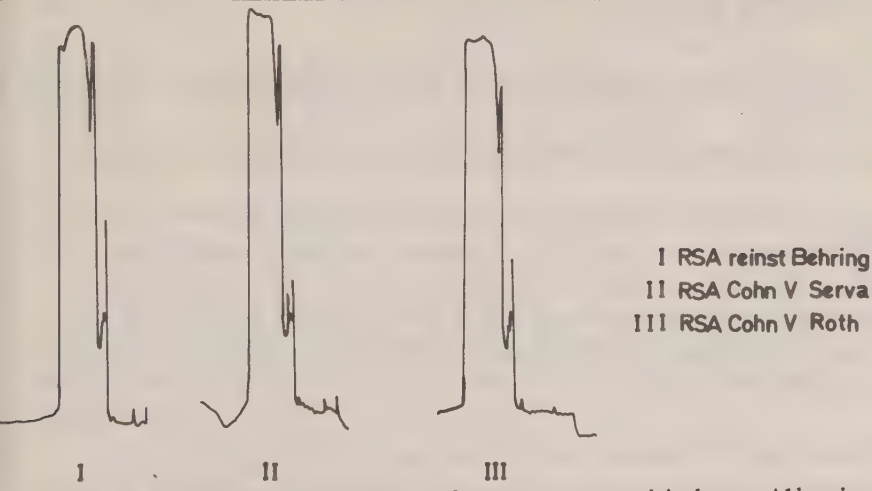


Abb.1o: Isotachophoretische Auftrennung verschiedener Albumine

[3] Wir danken der Firma LKB für die Durchführung der Isotachophoresen

3.1.4. Einfluß verschiedener Fraktionen von Humanserumalbumin

Der Zusatz von 1% Humanserumalbumin führte, unabhängig von der verwendeten Albuminfraktion, immer zu einem Haften der Zellen am Glas. Dies hatte jedoch keinen Einfluß auf die Vitalität, denn der Anteil an toten Zellen lag nach 12 Stunden in keiner Fraktion über 3%. Zum gleichen Zeitpunkt wurde in allen Medien ein durchschnittlicher Thymidineinbau von 5o% der Kontrolle gemessen (Tab.7).

Tabelle 7: Einbau von ^{14}C-Thymidin in EAT-Zellen in Medien mit verschiedenen Humanserumalbuminfraktionen nach 12 und 24 Stunden
(Relativwerte bezogen auf die Kontrollen in NM)

	Medium mit 1% Humanserumalbumin Fraktion Nr.				
	2o31	2o34	2o38	2o39	2o4o
nach 12 h	59	51	43	48	46
nach 24 h	3o	25	14	25	12

(Gemittelte Werte aus 2 Kulturen)

3.2. EAT-Zellen in Albuminmedien mit unterschiedlichen Zusätzen

3.2.1. Wirkung von Spurenelementen, Fe,Vitaminen und Insulin

Im Gegensatz zu Befunden der Literatur (Birch und Pirt 197o) führte der Zusatz von Fe^{++}(o.2 µg/ml), Cu^{++}(o.o5 µg/ml) und Mn^{++}(o.o3 µg/ml) weder in NM noch in 1-AM-S zu einer Veränderung der Zellvermehrung, des Laktat/Glucose Quotienten nach 1o Stunden, der Aufnahme von AIB und der Zellzyklusverteilung.

Ebenso waren Cyanocobalamin (o.oo5 µg/ml), Ascorbinsäure (4o µg/ml) oder Insulin (o.4 U/ml) ohne Effekt auf das Wachstum und den Laktat/Glucose Quotienten der Zellen in diesen Medien.

3.2.2. Einfluß von Spermidin und Polylysin

Bei noch nicht völlig geklärter Funktion der Polyamine läßt die an verschiedenen Zelltypen beobachtete positive Korrelation zwischen Zellproliferation und Polyamingehalt auf eine Funktion dieser Substanzen beim Wachstumsprozeß, insbesondere bei der Synthese makromolekularer Zellbestandteile schließen (Russel 1973; Baserga 1976). Um zu klären, ob exogen zugeführte Polyamine einen Einfluß auf das Wachstum von EAT-Zellen vor allem in AM haben, wurden Spermidin und Poly-L-Lysin in unterschiedlichen Konzentrationen dem Medium zugesetzt.

Bei nur leicht erhöhter Totzahl (2-8% in NM, 5 - 13% in AM) führte Spermidin in Endkonzentrationen von $1o^{-6}$ - $1o^{-2}$ M in NM und AM zu keiner Wachstumssteigerung. In AM wurde darüberhinaus mit zunehmender Spermidinkonzentration ein verstärkt auftretendes Anhaften der Zellen am Glas beobachtet. Analog dem Spermidin führte auch der Zusatz von Poly-L-Lysin ($1o^{-12}$ - $1o^{-8}$ M) zu keinem Anstieg der Vermehrungsrate. Vielmehr konnte in NM bei der höchsten Poly-L-Lysinkonzentration eine Wachstumshemmung um 15% beobachtet werden. Der Anteil an toten Zellen lag in NM nicht über dem der Kontrolle ohne Poly-L-Lysin, in AM war er mit 1o% gegenüber dem der Kontrolle (3%) erhöht. Die Vermehrungsraten in den AM waren nicht feststellbar, da auch mit steigender Konzentration an Poly-L-Lysin die Zellen vermehrt am Glas hafteten.

3.2.3. Effekt des pH-Wertes des Mediums auf Wachstum und Thymidineinbau

Unter Verwendung von Goodschen Puffern (2omM) wurden Albuminmedien mit pH-Werten von 7.2, 7.5, 7.8 und 8.o hergestellt und Vermehrungsrate sowie Thymidineinbau in diesen Medien untersucht.

Die Stoffwechselleistungen der Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Kulturmediums (1-AM-S) sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Stoffwechselparameter von EAT-Zellen in 1-AM-S mit unterschiedlichem pH-Wert in der 2.Passage in vitro = 1.Passage in AM.

Parameter	1 - AM - Cohnfraktion V - S							
pH-Wert zu Beginn d.Kultur	7.2		7.5		7.8		8.o	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
Vermehrung % des Ausg.-wertes	18	32	23	36	17	23	11	16
Anteil toter Zellen	2	2	1	2	1	4	2	1o
pH-Wert nach 24 h	6.85	6.45	7.2	6.85	7.5	7.2	7.8	7.5
Laktatpr. µMol/1o^{6}Z	5.52	-	6.oo	-	6.52	-	6.41	-
Glucoseverbr. µMol/1o^{6}Z	3.93	-	5.4o	-	5.69	-	5.77	-
L/G-Quotient	1.4o	-	1.11	-	1.15	-	1.11	-
Einbau von ^{14}C-Thymidin % der Kontrolle	47	93	100	100	51	34	50	20

Kontrolle = Zellen in 1-AM-S pH: 7.5
(Mittelwerte aus 2 Kulturen)

Die Ergebnisse zeigen, daß auch in AM der physiologische pH-Wert zu den besten Vermehrungsraten, der geringsten Totzahl und zur höchsten Thymidineinbaurate führte. Sie deuten ferner darauf hin, daß bei einer Änderung des pH-Wertes die Zellen eher

eine Verschiebung zum Sauren als zum Alkalischen hin tolerieren, wobei jedoch, unabhängig von der Richtung der pH-Verschiebung, die Neigung zum Haften am Glas bestehen blieb.

3.2.4. Auswirkungen der Dialyse der Albuminfraktionen

Obwohl isotachophoretisch kein großer qualitativer Unterschied zwischen der Cohnfraktion V von Serva und der von Roth festgestellt werden konnte, die EAT-Zellen aber in 2-AM-S eine höhere Wachstumsrate als in 2-AM-R zeigten, entstand die Frage, ob niedermolekulare Stoffe aus den Albuminpräparaten für diesen Effekt verantwortlich sein könnten. Es wurden daher verschiedene Stoffwechselparameter der Zellen in Medien mit Zusatz von dialysierten Albuminen gemessen.

Tabelle 9: Vergleich einiger Stoffwechselparameter von EAT-Zellen in Medien mit verschiedenen dialysierten und nichtdialysierten Albuminen in der 2.Passage in vitro = 1.Passage in AM.

Medium	Totzahl %	Einbau von ^{14}C-Thymidin		Einbau von ^{14}C-Leucin	
	n.24 h	n.12h	n.24h	n.12h	n.24h
Normalmedium	2	1oo	1oo	1oo	1oo
1-AM-B dialysiert	7	9o	9	133	122
1-AM-B n.dial.	(3)	(84)	(4o)	(1o7)	(41)
1-AM-S dialysiert	5	73	7	119	81
1-AM-S n.dial.	(3)	(51)	(17)	(54)	(26)
1-AM-R dialysiert	4	84	24	114	98

Gemittelte Werte aus 4 Kulturen.
(Die Zahlen in den Klammern geben die prozentualen Einbauraten von Zellen in Medien mit nichtdialysierten Albuminen an).

Wie aus Tab.9 zu entnehmen ist, führt der Zusatz von dialysierten Albuminen zu serumfreiem Medium bei den EAT-Zellen zu einem erhöhten Einbau von ^{14}C-Leucin gegenüber demjenigen von Zellen in Medium mit den entsprechenden nichtdialysierten Albuminen und/oder sogar dem von NM. Trotz sinkender Einbaurate in der 2.Hälfte der Passage, lagen die gemessenen Werte nach 24 Stunden in den Medien mit dial.Albuminen noch über 80% der Kontrolle (NM).

Weniger Einfluß hatte die Dialyse der Albumine auf den Thymidineinbau der Zellen. Dieser lag zwar in Medien mit dialysierten Albuminen innerhalb von 12 Stunden mit Werten um den Bereich der Kontrolle höher als bei Zusatz von nichtdialysierten Albuminen, fiel danach aber stark ab.

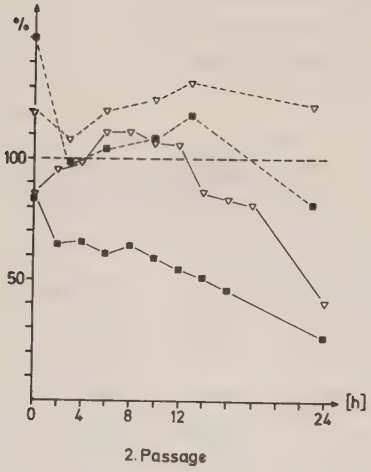


Abb.11:

Wirkung der Dialyse des Albumins auf die Proteinsynthese. Einbau von ^{14}C-Leucin in EAT-Zellen in Medien mit verschiedenen dial.und nichtdial. Albuminen (n=4)

(■—■) (■--■) 1-AM-S — nicht dial. / dialysiert

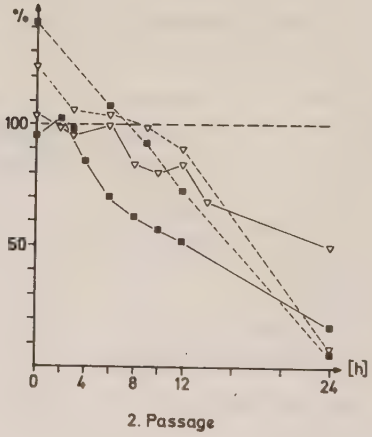


Abb.12:

Wirkung der Dialyse des Albumins auf die DNA-Synthese. Einbau von ^{14}C-Thymidin in EAT-Zellen in Medien mit verschiedenen dialysierten und nichtdial.Albuminen (n=4)

(▽—▽) (▽--▽) 1-AM-B — nicht dialysiert / dialysiert

Die Abb.11 und 12 zeigen einen Vergleich der über 24 Stunden gemessenen Einbauraten für Leucin und Thymidin in Medien mit dialysierten und nichtdialysierten Albuminen (1-AM-B und 1-AM-S). In diesen Graphiken werden nicht nur die unterschiedlichen Einbauraten der Zellen in Medien mit dialysierten und nichtdialysierten Albuminen deutlich, sondern sie zeigen ferner, daß auch hier wieder Zellen in Medium mit reinstem RSA die höchsten Einbauraten aufweisen. Die Vermehrungsrate war in allen AM aufgrund eines Glaswuchses nicht feststellbar. Der Anteil toter Zellen stieg von 3% im Medium mit nichtdialysierten Albuminen auf 7% in Medium mit dialysierten Albuminen an. Der Laktat/Glucose Quotient nach 12 Stunden lag in allen Medien bis zu 17% höher als der in NM zum gleichen Zeitpunkt.

3.2.5. Wirkung von Äthylendiamintetraessigsäure

Der deutliche Unterschied in den Einbauraten von Zellen in Medien mit dialysierten und nichtdialysierten Albuminen bestätigte, daß niedermolekulare Begleitsubstanzen der Albumine die gemessenen Stoffwechselaktivitäten beeinflussen. Eine dieser möglichen Substanzen ist das EDTA. In reinstem RSA sind nach Analysenangaben der Behringwerke 14.7 µg EDTA/g Protein enthalten.

Daher wurde diese, wie auch die doppelte Menge an EDTA dem Medium mit dialysiertem RSA (reinst, Behring) hinzugefügt. Als Kontrolle dienten Zellen in Medium mit 1% des entsprechenden nichtdialysierten Albumins.

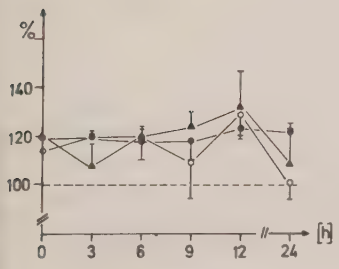


Abb.13:

Einfluß von EDTA auf den Leucineinbau der Zellen in 1-AM-B (n = 4)

Kontrolle: 1-AM-B nichtdialysiert

▲-▲ 1-AM-B dialysiert

○-○ 1-AM-B dialysiert + 29.4 g EDTA/g Protein

●-● 1-AM-B dialysiert + 14.7g EDTA/g Protein

Wie aus Abb.13 hervorgeht, hatte der Zusatz von EDTA in beiden Konzentrationen keinen oder einen geringen stimulierenden Effekt auf den Leucineinbau der Zellen. Jedoch stieg die Totzahl bei der doppelten EDTA-Konzentration von 3% auf 6% an.

3.2.6. Effekt von N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure (Hepes)

In allen AM war, bedingt durch das Fehlen des Serums, ein gegenüber NM erhöhter pH-Wert zu finden, der im Verlauf einer 24-stündigen Kultur infolge Fehlens der Puffersubstanzen des Serums (Bikarbonat-, Phosphatpuffer, Protein) stärker abfiel als in NM. Durch Zusatz von HEPES (2o mM Endkonzentration) konnte, wie Tabelle 1o zeigt, sowohl der pH-Wert des frischen AM dem von NM angeglichen wie auch ein stärkerer pH-Abfall im Verlauf der Kultur verhindert werden. Die Puffersubstanz selbst hatte in der eingesetzten Menge keinen Einfluß auf den Laktat/Glucose Quotienten der Zellen in NM und AM nach 1o Stunden sowie die Vermehrungsrate und Totzahl der Zellen nach 24 Stunden.

Tabelle 1O: Einfluß von N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure (Hepes) (2o mM Endkonzentration) auf den pH-Wert verschiedener Kulturmedien vor und nach 24-stündiger Inkubation mit Zellen (n=4).

	frisches Medium		gebrauchtes Medium (nach 24 h)		ΔpH	ΔpH
Medium	-HEPES	+HEPES	-HEPES	+HEPES	-HEPES	+HEPES
Normal-medium	7.5	7.5	7.1±o.1	7.2±o.1	o.4	o.3
1-AM-B	7.7	7.5	7.1±o.2	7.2±o.1	o.6	o.3
1-AM-S	7.6	7.5	6.9±o.1	7.2±o.2	o.7	o.3

3.3. EAT-Zellen in variierten Normalmedien

Medium mit dialysiertem Pferdeserum

Die Vermehrungsrate von Zellen in Medium mit 15 % dialysiertem Pferdeserum lag nach 12 Stunden bei 23%, nach 24 Stunden bei 65 % und betrug somit 88% der Kontrolle. Der Anteil toter Zellen zeigte mit 2% keinen Unterschied zu dem von Zellen in NM. Der Laktat/Glucose Quotient war nach 12 Stunden aufgrund eines geringeren Glucoseverbrauchs der Zellen in diesem Medium, durchschnittlich um 17% gegenüber dem in NM erhöht.

Den Verlauf des ^{14}C-Thymidin-, ^{14}C-Uridin- und ^{14}C-Lysin-Einbaus innerhalb von 24 Stunden gibt Abb.14 wieder.

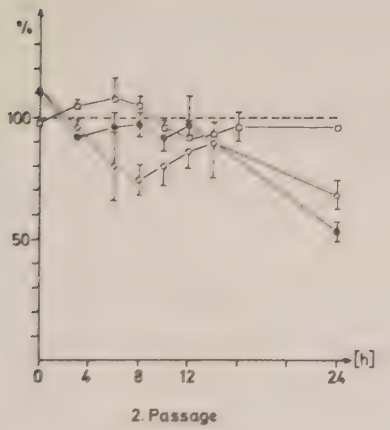


Abb.14:
Einfluß der Serumdialyse auf DNA- RNA- und Proteinsynthese

Einbau von markiertem Lysin (□-□), Thymidin (○-○) und Uridin (●-●) in EAT-Zellen in Medium mit 15% dialysiertem Pferdeserum (n = 4).

Danach hatte die Dialyse des Pferdeserums praktisch keinen Einfluß auf die Lysin-Einbauraten der Zellen, führte jedoch zu einem vorübergehenden Abfall der Thymidineinbauraten auf 75% der Kontrolle.

Der Einbau von Uridin blieb ebenso wie in den AM zunächst (über 12 Stunden) unverändert und fiel erst in der 2.Hälfte der Passage nach 24 Stunden auf 53% der Kontrolle ab.

Setzte man die durch Dialyse des Serums entfernten niedermolekularen Komponenten (MG >15 ooo) als Lyophilisat den AM zu, so konnte dadurch kein besseres Wachstum erzielt werden.

3.3.1. Medium mit 1o% Kalbsserum

Die folgenden Versuche sollten zeigen, ob und inwieweit sich die Herkunft des Serums auf das Wachstum und den Stoffwechsel von EAT-Zellen auswirkt.

Eine Übersicht über die Vermehrungsrate in Abhängigkeit von der Serumspecies gibt Tab.11.

Tabelle 11: Vergleich der Vermehrungsraten von EAT-Zellen in Medium mit 15% Pferde- oder 1o% Kalbsserum[5] während der 2.Passage in vitro.

1.Passage	+ 15% Pferdeserum		+ 1o% Kalbsserum	
2.Passage	+ 15% PS Kontrolle	+ 1o% KS	+ 15% PS	+1o%KS
Nach 12 h	46 ± 14	24 ± 7	28 ± 7	17 ± 2
Nach 24 h	59 ± 22	34 ± 15	59 ± 16	31 ± 17
Anteil toter Zellen	2 ± 1 (n=7)	5 ± 4 (n=7)	2 ± 1 (n=7)	6 ± 3 (n=7)
pH-Wert n. 24 h	7.0	7.0	7.0	7.0

[5] Herrn Prof.Dr.D.Schachtschabel danke ich für die freundliche Überlassung des Kalbsserums.

Aus den gegenüber der Kontrolle geringeren Wachstumsraten der Zellen in Medium mit Kalbsserum (KS), sowie der in diesem Medium gefundenen erhöhten Totzahl kann man schließen, daß jede Zellart species-spezifische Serumkomponenten für ihr optimales Wachstum benötigt. Die Laktatproduktion und der Glucoseverbrauch der Zellen in Medium mit KS in der 2.Passage in vitro lagen im Bereich von ± 1o% der Kontrolle (Tab.12), die molaren Laktat/Glucose Quotienten waren nach 12 Stunden bis zu 15% höher als in NM.

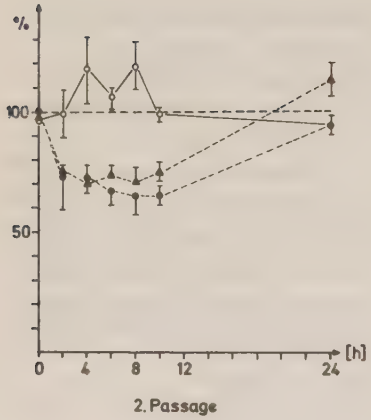
Tabelle 12: Zeitlicher Verlauf der Laktatproduktion und des Glucoseverbrauchs von EAT-Zellen in Medium mit 15% Pferdeserum oder 1o% Kalbsserum während der 2.Passage in vitro (n=4).

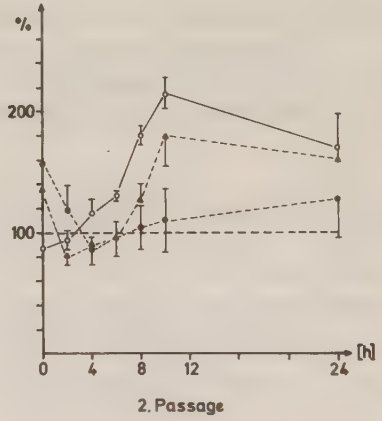
Art des Serums in der 1.und 2.Passage		Laktatproduktion $\mu Mol/_{10^6}Z$			Glucoseverbrauch $\mu Mol/_{10^6}Z$			L/G Quot.
1.P.	2.P.	0 - 4	4 - 8	8 - 12	o - 4	4 - 8	8 - 12 h	
PS	PS	2.44 ±o.34	3.73 ±o.57	2.87 ±o.91	1.97 ±o.55	2.99 ±o.42	2.10 ±o.13	1.28
PS	KS	3.48 ±o.7o	2.93 ±o.65	3.27 ±o.25	2.2o ±o.44	2.49 ±o.23	2.11 ±o.2o	1.42
KS	PS	2.94 ±o.63	2.76 ±o.3o	3.43 ±o.86	2.22 ±o.42	2.59 ±o.15	2.41 ±o.26	1.26
KS	KS	2.81 ±o.26	2.84 ±o.62	2.94 ±o.1o	1.97 ±o.22	2.25 ±o.o4	2.29 ±o.44	1.31

Wie aus den Abb.15 und 16 zu ersehen ist, zeigten Zellen in Abhängigkeit von der Art des Serums im Nährmedium erhebliche Unterschiede in der Aufnahme von AIB und CL.

Die höchsten Transportraten für beide Aminosäuren zeigten jene Zellen, die in der 1.Passage in vitro PS und in der 2.Passage KS erhalten hatten. Die ermittelten Aufnahmeraten lagen für AIB zeitweise bei 14o%, für CL erreichten sie vorübergehend sogar 21o% der Kontrolle.

Zellen, die in der 1.Passage KS erhalten hatten, zeigten, nach zunächst gegenüber der Kontrolle erniedrigten Transportraten für beide Aminosäuren, im Verlauf der Kultur ansteigende Aufnahmeraten für CL und AIB, wobei das Ausmaß des Transports sowohl von der Art der aufgenommenen Aminosäure wie von der in dieser Passage verwendeten Serumart abhing.





Einfluß der Art des Serums
auf den Aminosäuretransport

Abb.15: Aufnahme von 2-AIB

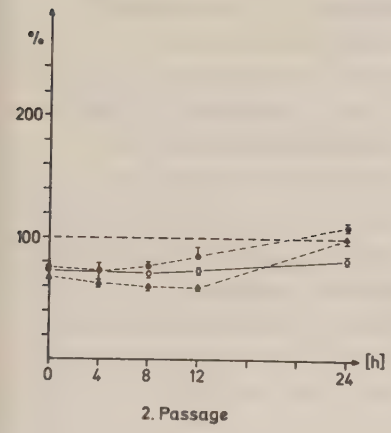
Abb.16: Aufnahme von Cycloleucin

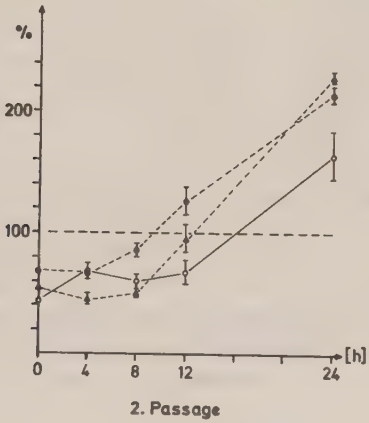
in die Zellen in Medium mit 15% Pferdeserum oder 1o% Kalbsserum während der 2.Passage in vitro (n=4)

PS ► PS = Kontrolle = 1oo%
PS ► KS ○-○
KS ► PS ●-●
KS ► KS ▲-▲

Weniger deutlich war die Reaktion der Zellen auf einen Serumwechsel beim Einbau von Uridin (Abb.17). Dieser lag bereits zu Beginn der Kultur in allen Medien (2.Passage) zwischen 6o% und 85% der Kontrolle und veränderte sich innerhalb der

ersten 12 Stunden unabhängig von der Serumart der 1. oder 2.Passage nur wenig. Erst nach 12-stündiger Kulturdauer erreichte er annähernd Kontrollwerte. Ähnlich dem Uridineinbau lagen auch die für Thymidin gemessenen Einbauraten in allen Medien zu Beginn der Kultur niedriger als die der Kontrolle (4o - 7o%), stiegen jedoch nach einigen Stunden sehr schnell an, so daß nach 24 Stunden Werte zwischen 16o und 23o% der Kontrolle gemessen werden konnten (Abb.18).





Einfluß der Art des Serums auf die

Abb.:17 RNA-Synthese

Abb.18: DNA-Synthese

Einbau von Uridin (Abb.17) und Thymidin (Abb.18) in die EAT-Zellen in Medium mit 15% Pferdeserum oder 1o% Kalbsserum während der 2.Passage in vitro (n=4)

PS ➤ PS Kontrolle (1oo%)
PS ➤ KS ○-○
KS ➤ PS ●-●
KS ➤ KS ▲-▲

Der Verlauf des Leucineinbaus der Zellen in der 2.Passage richtete sich wiederum stark nach der Art des Serums in der 1.Passage. Hatten die Zellen in dieser KS erhalten, so fiel der Einbau von Leucin unabhängig von der Art des Serums in der 2.Passage auf 5o - 6o% der Kontrolle ab (Abb.19). Dagegen zeigten Zellen, die zuerst in Medium mit PS und erst in der 2.Passage in Medium mit KS wuchsen, einen gleichmäßigen Leucineinbau zwischen 65 und 75% der Kontrolle über den gesamten Inkubationszeitraum.

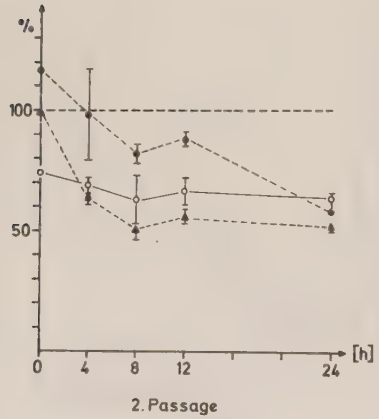


Abb.19:
Einfluß der Serumart auf die Proteinsynthese
Einbau von Leucin in die Zellen in Medium mit 15% Pferdeserum während der 2.Passage in vitro (n=4)

PS ➤ PS Kontrolle 1oo%
PS ➤ KS ○-○
KS ➤ PS ●-●
KS ➤ KS ▲-▲

3.3.3. EAT-Zellen im Brutschrank mit Dreheinrichtung

Erfolgte nicht nur bei jeder Probenahme (alle 2 - 4 Stunden) eine gute Durchmischung der Zellen im Inkubationsmedium, sondern wurden die Zellen kontinuierlich durch Drehung der Kulturflasche (1 U / 2.5 min) bewegt, so konnte die Vermehrungsrate, wie Tab.13 zeigt, kaum angehoben, jedoch gleichzeitig ein Anstieg der Totzahl beobachtet werden.

Tabelle 13: Zellvermehrung, Anteil toter Zellen, Laktatproduktion und Glucoseverbrauch von EAT-Zellen in Normalmedium nach 24 Stunden (2.Passage).
a) im Wasserbad
b) im Brutschrank mit Dreheinrichtung

Art der Inkubation	Vermehrung in %	Anteil toter Z. in %	Laktatproduktion $\mu Mol/_{10}{}^{6}Z$	Glucoseverbr. $\mu Mol/_{10}{}^{6}Z$
Normalmedium a)	79 ± 8 (n=30)	2	o.73o±o.133	o.592±o.o98
			L/G Quotient:1.23	
Normalmedium b)	82 ± 7 (n=8)	4	o.719±o.123	o.551±o.116
			L/G Quotient:1.30	

In 1-AM-S führte eine kontinuierliche Bewegung der Kulturen in den meisten Versuchen zur Koagulation der Zellen nach 12 bis 24 Stunden. Lediglich in einigen Fällen konnte eine Zunahme der Vermehrungsrate von 38% auf 57% bei drehender Inkubation der Zellen nach 24 Stunden beobachtet werden.

EAT-Zellen in 1-AM-B neigten auch im Inkubationsschrank trotz permanenter Bewegung zu verstärktem Haften am Glas. Ein Koagulieren der Zellen wurde teilweise bereits nach 6 - 8 Stunden beobachtet.

3.4. Vergleich der Stoffwechselaktivitäten von EAT-Zellen in NM und AM über mehrere Passagen in vitro

Aufgrund der in den verschiedenen AM gemessenen unterschiedlichen Stoffwechselaktivitäten von EAT-Zellen, schien es uns ratsam, alle weiteren Untersuchungen an Zellen in 1- oder 2-AM-S durchzuführen. Obwohl die in 1-AM-B gemessenen Syntheseleistungen der Zellen durchschnittlich höher lagen als in AM-S, sprachen der regelmäßig auftretende Glaswuchs in diesem AM - und dadurch bedingt die Schwierigkeiten der Zell-

zahlermittlung - wie auch die erhöhte Empfindlichkeit der Zellen in diesem Medium gegenüber mechanischer Belastung gegen eine weitere Verwendung dieses Albumins.

In der 3. und 4. Passage in vitro (II.und III.in AM) sank die Vermehrungsrate der Zellen in NM auf durchschnittlich 51 - 55% ab, die Zahl der toten Zellen in AM betrug in der II.Passage 17% bei 1o% toten Zellen, in der III.Passage nur noch 8%. Der Anteil toter Zellen war dann bereits erheblich erhöht.

Tabelle 14: Vermehrungsrate und Anteil toter Zellen in NM und 1-AM-S im Verlauf mehrerer Passagen in vitro

Medium	2.Passage in vitro (I.in AM)		3.Passage in vitro (II.in AM)		4.Passage in vitro (III.in AM)	
	Wachstum (Proz.Zunahme d. Zellz.)	Anteil toter Zellen %	Wachstum (Proz.Zunahme d. Zellz.)	Anteil toter Zellen %	Wachstum (Proz.Zunahme d.Zellz.)	Anteil toter Zellen %
Normalmedium	68±15 (n=26)	2±1	51±19 (n=26)	4±1	53±19 (n=26)	4±1
1-AM-S	3o±7 (n=2o)	3±1	15±9 (n=2o)	1o±4.5	8±6 (n=2o)	3o±7
% der Kontrolle	44		29		15	

Der Transport von AIB (Abb.2o) in die Zellen in NM war auch über weitere Passagen hin normal und bei einem leichten Anstieg der durchschnittlich gemessenen Werte blieb auch die Cycloleucinaufnahme in NM weitgehend konstant. Dagegen sank die Aufnahme von AIB in AM in der I. und II.Passage auf 7o - 9O %, in der III. auf 55% der Kontrolle ab. Wesentlich stärker beeinträchtigt war im gleichen Medium der Transport für CL. Während dieser in der 2.Passage die in NM gemessenen Werte bis um 55% übertroffen hatte, lagen die innerhalb der ersten 1o Stunden gemessenen Werte in der 3. und 4. Passage nur noch bei 7o - 8o% der Kontrolle und erst am Ende jeder Passage wurden wieder Kontrollwerte erreicht (Abb.21).

Über mehrere Passagen nahezu unverändert blieben, wie aus Abb.22 und 23 zu ersehen ist, auch die Einbauraten für Thymidin und Leucin in NM. Dagegen nahmen sie in AM mit jeder weiteren Passage annähernd gleichmäßig stark ab.

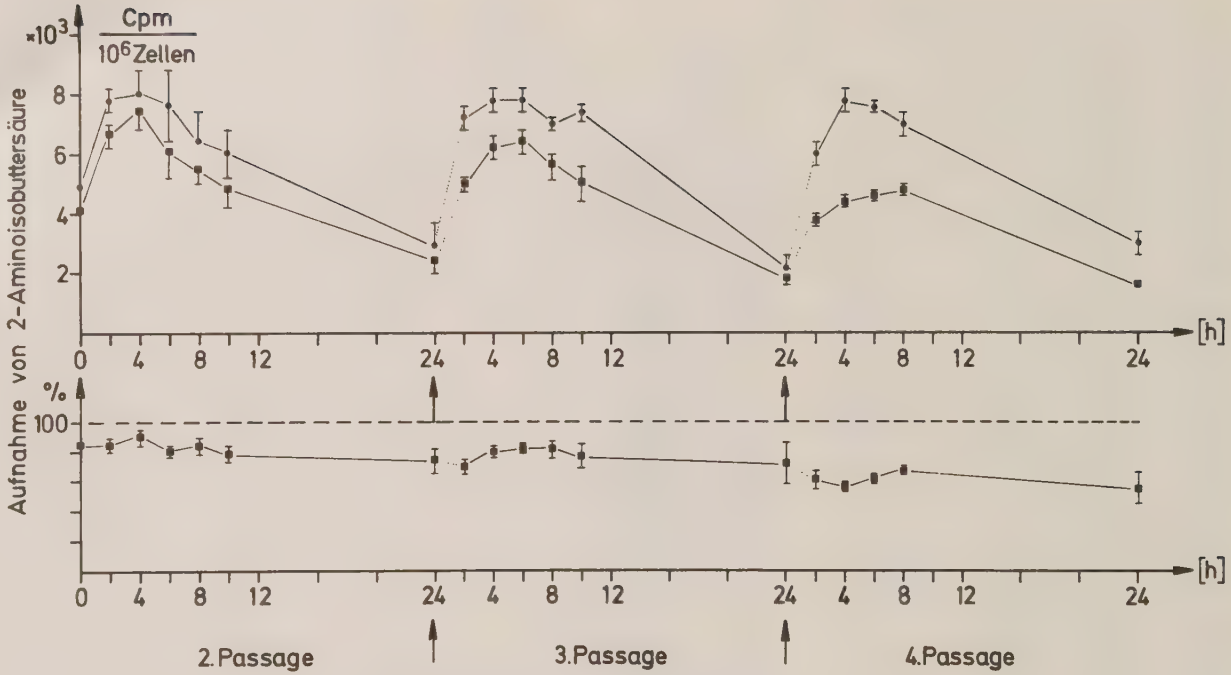


Abb.20: Aufnahme von AIB in die Zellen in Normalmedium (●-●) und 1-AM-S (■-■) über mehrere Passagen in vitro (n = 4)

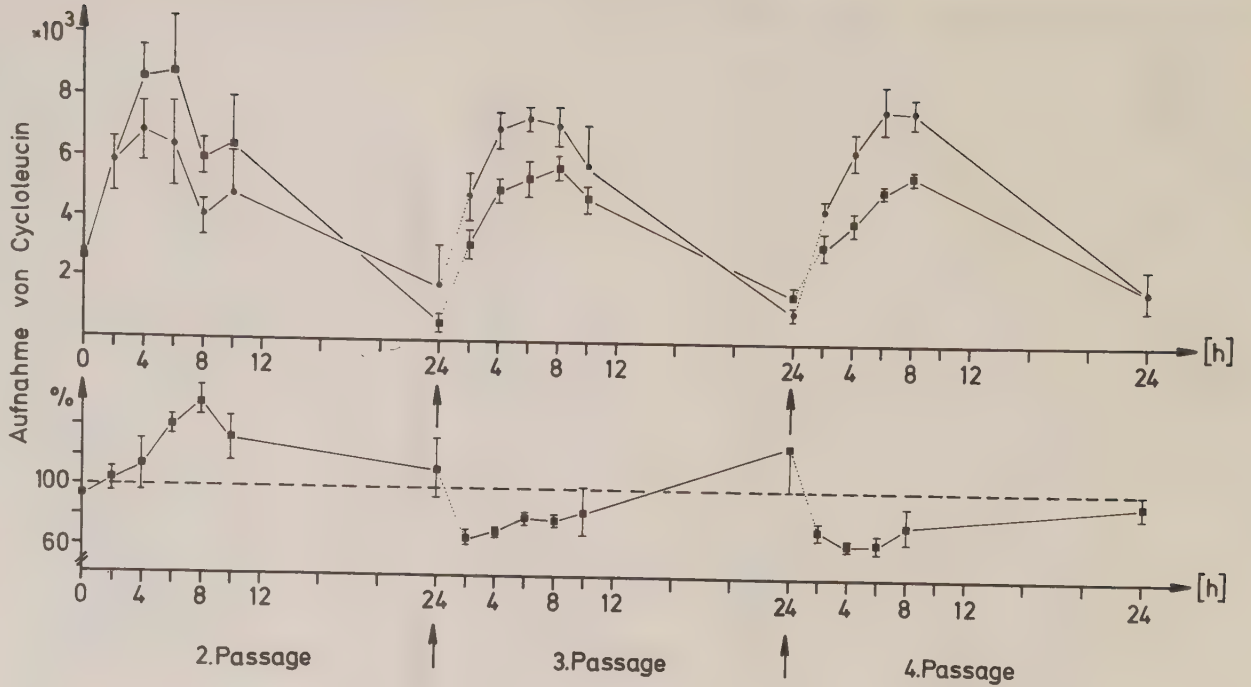


Abb.21: Aufnahme von Cycloleucin in EAT-Zellen in Normalmedium (● - ●) und 1-AM-S (■ - ■) über mehrere Passagen in vitro (n = 4)

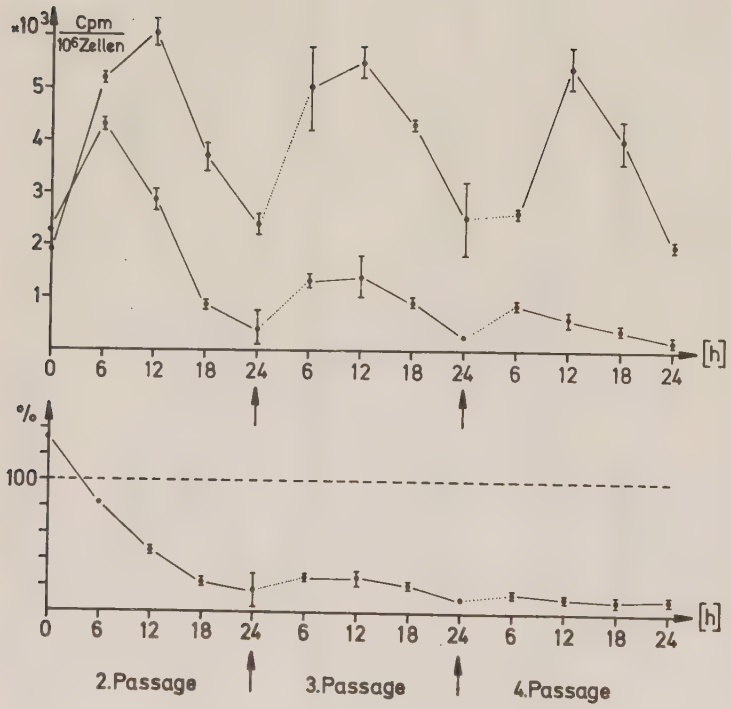


Abb.22: DNA-Synthese von EAT-Zellen in Normal- und Albuminmedium über mehrere Passagen in vitro
Einbau von ^{14}C-Thymidin in die Zellen in Normalmedium (✱ - ✱) und in 2-AM-S (● - ●)
Relativwerte (n=4)
Absolutwerte (n=2)

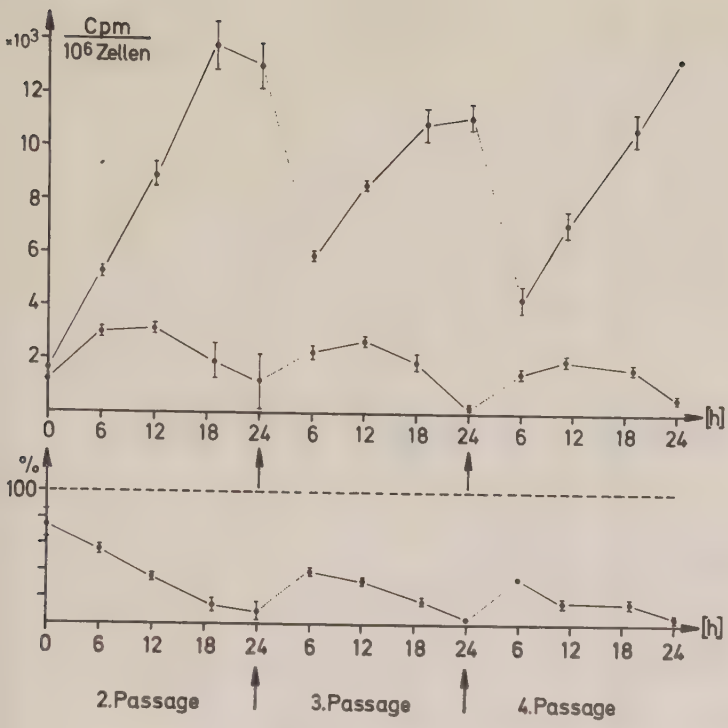


Abb.23: Proteinsynthese von EAT-Zellen in Normal- und Albuminmedium über mehrere Passagen in vitro
Einbau von ^{14}C-Leucin in die Zellen
in Normal (✱ - ✱) und in 2-AM-S (● - ●)
Absolutwerte (n=2)
Relativwerte (n=4)

Auffallend beim Uridineinbau war selbst der in NM kontinuierliche Abfall der Einbauraten in der 3. und 4.Passage in vitro (Abb.24). Das Maximum des Uridineinbaus von Zellen in NM war in der 3.Passage bereits auf die Hälfte gegenüber dem der 2.Passage abgefallen und in der 4.Passage gar nicht mehr zu erkennen. Zellen in AM bauten in der 3. und 4. Passage ebenfalls weniger Uridin ein.
Die prozentualen Einbauraten lagen zwischen 7o und 9o % der Kontrolle.

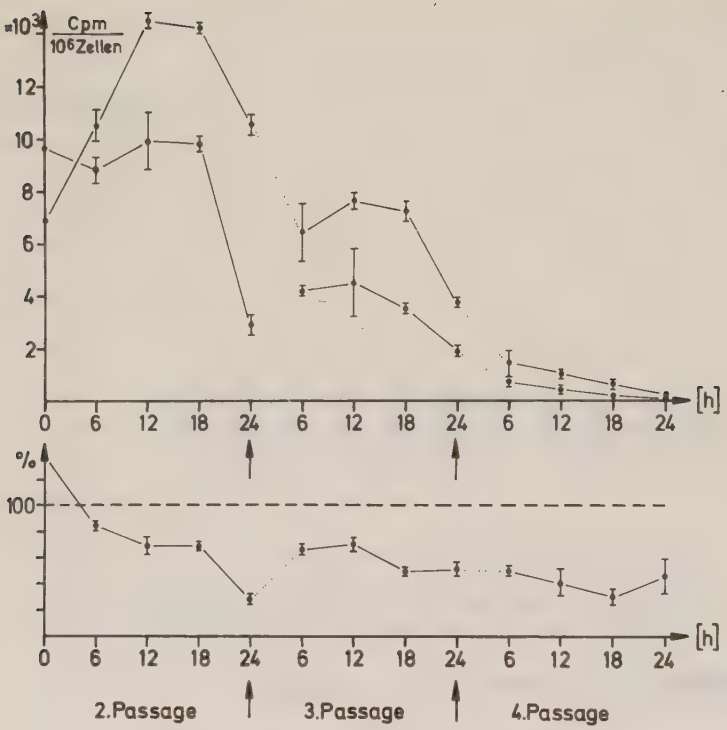


Abb.24: RNA-Synthese von EAT-Zellen in Normal- und Albuminmedium über mehrere Passagen in vitro
Einbau von ^{14}C-Uridin in die Zellen in Normal (● - ●) und in 2-AM-S (● - ●)
Absolutwerte (n=2)
Relativwerte (n=4)

Die Aufnahme von 2-Desoxyglucose zeigte in NM eine leicht steigende Tendenz. Die maximalen Einbauraten in der 3. und 4.Passage lagen etwa um 3o% höher als die in der 2.Passage in vitro. In AM bewegten sich die Transportraten der Zellen in allen Passagen zwischen 3o und 6o% der Kontrolle (Abb.25).

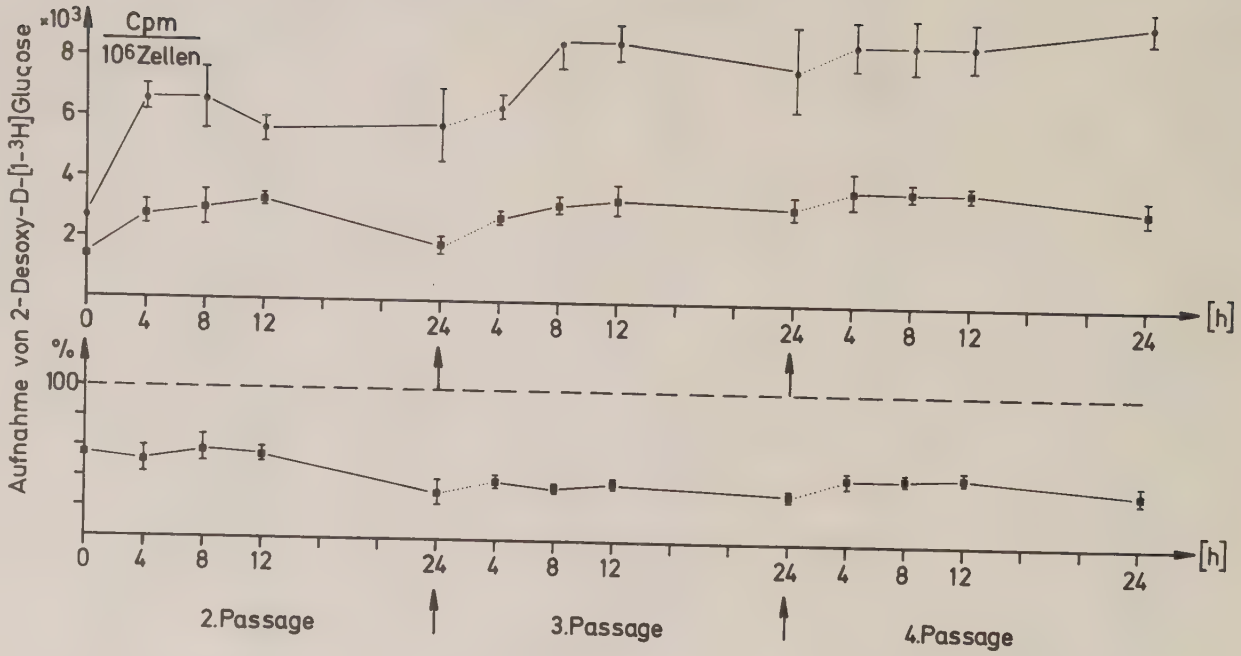


Abb.25: Aufnahme von ^{3}H-Desoxyglucose von EAT-Zellen in Normalmedium (✱-✱) und 2-AM-S (■-■) (n = 4)

In der Zellzyklusverteilung wurde ein deutlicher Unterschied zwischen Zellen in NM und AM erst in der 3. und 4.Passage durch einen verzögerten Anstieg des G2/G1-Verhältnisses in 2-AM-S-Kulturen sichtbar (Abb.26).

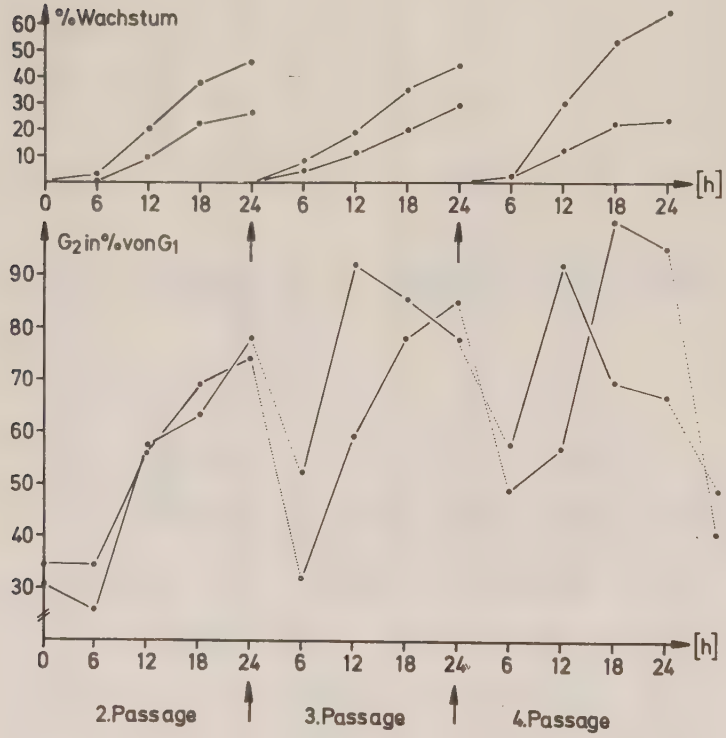


Abb.26: Zeitlicher Verlauf des G2/G1-Verhältnisses ermittelt aus den DNA-Histogrammen von EAT-Zellen in Normalmedium (● - ●) und 2-AM-S (● - ●) im Verlaufe mehrerer Passagen in vitro (n = 4).

Eine Besonderheit unter allen gemessenen Parametern zeigte die Cholinaufnahme der Zellen. Während sie in NM über mehrere Passagen hinweg konstant blieb, stiegen die in AM gemessenen Aufnahmeraten für Cholin mit jeder weiteren Passage in vitro erheblich an (Abb.27). Dieser Befund war Anlaß, nach der Ursache der erhöhten Cholinaufnahme und dem Verbleib des Cholins in der Lipidfraktion der Zellen in AM zu suchen.

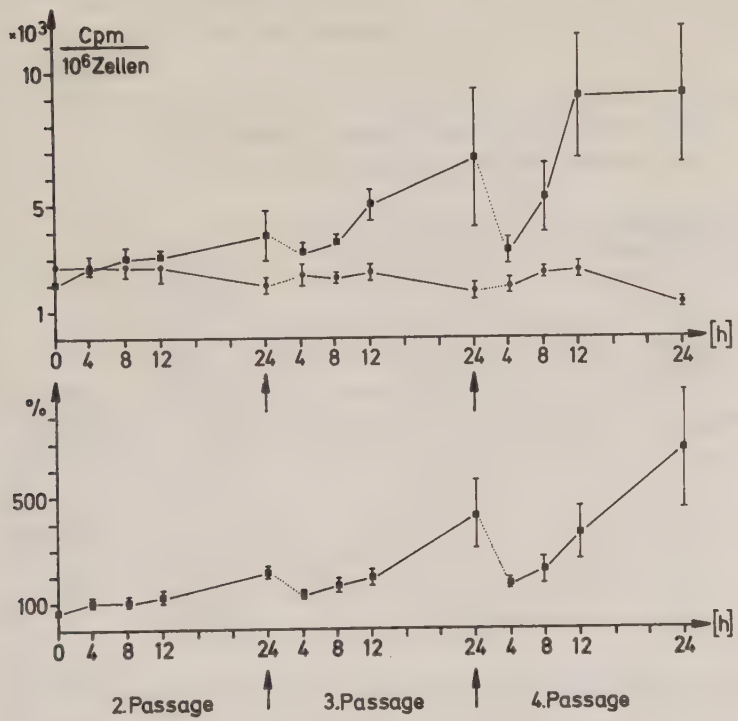


Abb.27: Aufnahme von Methyl-^{3}H-Cholin in EAT-Zellen in Normalmedium (● - ●) und 1-AM-S (■ - ■) über mehrere Passagen in vitro (n = 4)

3.5. Veränderungen im Lipidstoffwechsel von EAT-Zellen in NM und AM

3.5.1. Zunahme an Gesamtlipiden

Ausgehend von einem gleichen Lipidgehalt der Zellen zu Beginn der 2.Passage in vitro, nahmen die Gesamtlipide innerhalb von 24 Stunden in NM um 55% zu und blieben in AM mit +3% nahezu unverändert (Tab.15). Am Ende der 4.Passage in vitro war der Gesamtlipidgehalt in NM um 79%, in AM um 35% angestiegen. Im gleichen Zeitraum (72 Stunden) nahm der Cholesteringehalt [4] in NM um 9% im AM dagegen um 34% zu.

Tabelle 15: Gesamtlipid- und Cholesteringehalt (in $\mu g/1o^6 Z$) von EAT-Zellen nach mehreren Passagen in vitro in Normal- und Albuminmedium (1-AM-S).

Medium	Beginn der 2.Passage in vitro = I. in AM		Ende der 2.Passage in vitro = II. in AM		Ende der 4.Passage in vitro = III. in AM	
	Gesamt-lipide	Chol.	Gesamt-lipide	Chol.	Gesamt-lipide	Chol.
Normal-medium	3o.3 ±2.5 (n = 12)	1.82 [1]	47.1 ±15.3 (n=8)	1.9 [1]	54.o ±14.5 (n=4)	1.98 [1]
1-AM-S	32.2 ±3.5 (n=12)	1.84 [1]	33.2 ±6.9 (n=8)	2.o [1]	43.5 ±9.3 (n=4)	2.46 [1]

[1] Mittelwerte aus 2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemachten Versuchen.

Wie aus Tab.16 hervorgeht, deutete der Einbau von ^{3}H-Acetat nach 12 - 24 Stdn. ebenfalls auf eine gedrosselte Lipidsynthese der Zellen in AM hin. Der Einbau in die Totallipide und die Aufnahme von markiertem Acetat in die PCA-lösl.Zellfraktion waren auf durchschnittlich 45 - 7o% der Kontrolle gefallen.

[4] Fr.Dr.Löffler danke ich für die Durchführung der Cholesterinbestimmungen

Tabelle 16: Aufnahme und Verstoffwechselung von ^{3}H-Acetat und EAT-Zellen in unterschiedlichen Medien (Relativwerte bezogen auf die Kontrollen in %)

Medium	Totallipide		TCA-fällbare Fr.		PCA-lösl.Fr.	
	n.12h	n.24h	n.12h	n.24h	n.12h	n.24h
Normal-medium	100	100	100	100	100	100
1-AM-S	46 ±3	52 ±9	43 ±4	7o ±14	60 ±1	59 ±21
Medium m. dialys.Ser.	67 ±2 (n=2)	62 ±9 (n=6)	71 ±3 (n=2)	65 ±4 (n=6)	1o7 ±1 (n=2)	74 ±3 (n=6)

In Medium mit dialysiertem Serum lagen die gemessenen Werte bis auf die PCA-lösliche Fraktion, zwischen denen der Kontrolle und AM.

Sowohl die Aufnahme von Acetat in die PCA lösliche Zellfraktion wie auch der Einbau dieser Lipidvorstufe waren in allen Medien im Verlauf der Kultur nicht konstant, sondern nahmen, wie Tab.17 zeigt, von 12 nach 24 Stunden ab.

Tabelle 17: Aufnahme und Verstoffwechselung von ^{3}H-Acetat durch EAT-Zellen in verschiedenen Medien in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Inkubation (n=4) (Als Kontrolle dienen die 12-Stunden-Werte)

Medium	Totallipide		TCA-fällbare Fr.		PCA-lösl.Fr.	
	n.12h	n.24h	n.12h	n.24h	n.12h	n.24h
Normal-medium	100	67 ±2	100	68 ±3	100	31 ±2
1-AM-S	100	67 ±2	100	79 ±14	100	53 ±15
Medium m. dialys.S.	100	63 ±1 (n=4)	100	70 ±12 (n=4)	100	31 ±10 (n=4)

Bei Verwendung von Leucin wurden, im Vergleich zur gesamten, in die säureunlösliche Zellfraktion eingebauten Leucinmenge, maximal 2% in den Totallipiden gefunden, wobei kein Unterschied zwischen NM und AM bestand.

3.5.2. Messung der Synthese von Phospholipiden

a) Cholin als Vorstufe

Wie bereits unter 3.4 beschrieben, nahm die durch Pulsmarkierung zu verschiedenen Zeiten der Kultur gemessene Aufnahme von Cholin durch die Zellen in AM innerhalb von 24 Stunden um das 3-fache zu, während sie in NM nahezu unverändert blieb. Die Ursache dieses erhöhten Anteils an ^{3}H-Cholin in Albuminzellen lag sowohl in einer erhöhten Aufnahmegeschwindigkeit (Abb.28) wie auch in einem verstärkten Einbau dieser Vorstufe in die säureunlösliche Fraktion dieser Zellen.

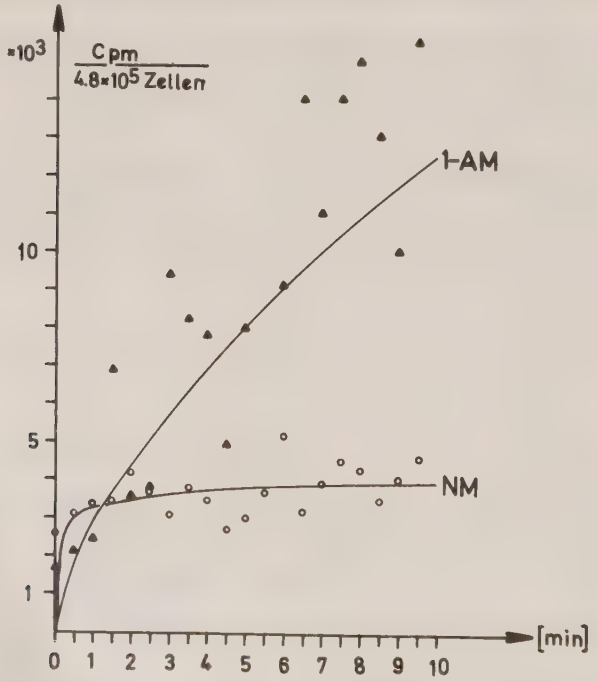


Abb.28: Aufnahme von ^{3}H-Cholin in EAT-Zellen in Normalmedium (● - ●) und 1-AM-S am Ende der 2.Passage in vitro (=1.Passage in Albuminmedium). Die Kurven wurden aus den gemessenen Werten mit Hilfe der Funktion $Y = ax^{b}$ ermittelt.

Am Ende der 2.Passage in vitro (1.Passage in AM) wurde in der Lipidfraktion der Zellen aus AM durchschnittlich eine 11- (^{3}H-Cholin) bis 13-fache (^{14}C-Cholin) größere Menge an markiertem Cholin gefunden als in der Zellfraktion von Zellen aus NM. Blieben die Zellen noch über weitere 48 Stunden in diesem serumfreien Medium, so stieg der Einbau von ^{3}H-Cholin in die Totallipide um das 23-fache gegenüber dem in die Totallipide von Zellen in NM an (Tab.18).

Tabelle 18: Aufnahme und Verstoffwechselung von ^{3}H-Cholin durch Zellen in NM und 1-AM-S nach der 2. und 4. Passage in vitro.
(Relativwerte bezogen auf die Kontrollen)

Medium	Totallipide	TCA fällb.Fr.	PCA-lösl.Fr.
	2. Passage in vitro (I. in AM)		
Normal-medium	100	100	100
1-AM-S	1o89±522	9o5±451	175±57
	(n=8)	(n=8)	(n=8)
Medium mit dialysiertem Pferdeserum	82±31	99±38	88±41
	(n=8)	(n=8)	(n=8)
	4. Passage in vitro (II. in AM)		
Normal-medium	100	100	100
1-AM-S	235o±1421	1419±296	157±8
	(n=2)	(n=2)	(n=2)
Medium mit dialysiertem Pferdeserum	91±5	51±11	9o±18
	(n=2)	(n=2)	(n=2)

Die Autoradiographie der chromatographisch getrennten Lipide (Trennsystem A) zeigte sowohl bei ^{3}H- wie ^{14}C-Cholin-Markierung in NM und AM zwei voneinander getrennte Banden im Bereich der Phospholipide. Die untere Bande, durch Referenzsubstanzen als Phosphatidylcholin (Lecithin) identifiziert, war in AM deutlich stärker geschwärzt als in NM. Die obere, nicht regelmäßig auftretende Bande, war in beiden Medien gleich stark markiert, konnte aber mit Referenzsubstanzen nicht identifiziert werden (Abb.29).

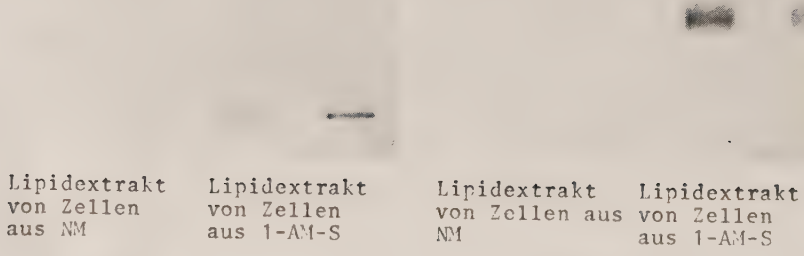


Abb.29: Chromatographische Auftrennung des Lipidextraktes von Zellen in NM und 1-AM-S nach vorausgegangener Inkubation mit ^{3}H-Cholin.

Bei Anwendung der üblichen Methode zur Quantifizierung markierter Banden auf dem Chromatogramm, dem Ausheben der angefärbten Flecke, konnte gezeigt werden, daß eine weitere Bande unterhalb des Phosphatidylcholins, die auf der Photoplatte nicht zu erkennen war, noch geringe Aktivität enthielt. Mit Hilfe von Referenzsubstanzen gelang es, diese Bande als das, durch Abspaltung einer Fettsäure aus dem Lecithin entstandene Lysolecithin zu identifizieren. Der Gebrauch eines Phospholipidtrennsystems (Trennsystem B) zur Auftrennung des Lipidextraktes brachte zwar eine Verbesserung der Trennschärfe aller Phospholipide, hatte jedoch den Nachteil, daß gering markierte Banden, vermutlich bedingt durch die gespreizte Trennung der Phospholipide in diesem System, nicht mehr sichtbar wurden. Die Autoradiographie eines in diesem Trennsystem gelaufenen Chromatogramms zeigte nur die Bande des Phosphatidylcholins.

b) Äthanolamin als Vorstufe

Zur Überprüfung der Frage, ob auch andere Phospholipidvorstufen als Cholin in Albuminmedium vermehrt aufgenommen und in die Lipide eingebaut werden, wurden die gleichen Versuche mit ^{14}C-Äthanolamin wiederholt.

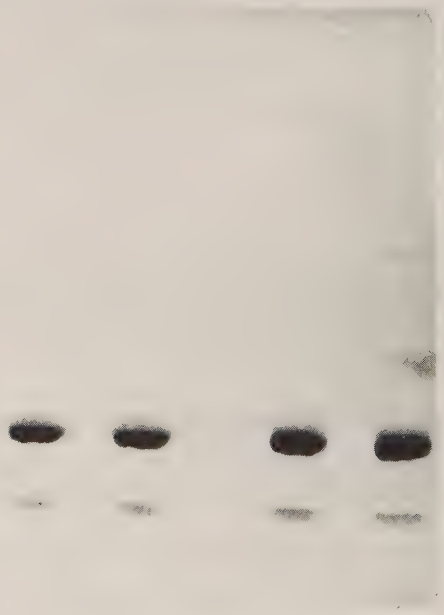
Tabelle 19: Aufnahme und Verstoffwechselung von ^{14}C-Äthanolamin von Zellen in 1-AM-S nach der 2.Passage in vitro (Relativwerte bezogen auf die Kontrollen)

Medium	Totallipide	TCA-fällbare Fr.	PCA-lösl.Fr.
Normal-medium	100	100	100
1-AM-S	170±12 (n=4)	173±15 (n=4)	150±25 (n=4)

Wie aus Tabelle 19 hervorgeht, enthielten sowohl die TCA lösliche wie auch die Totallipidfraktion der Zellen in AM ebenfalls erhöhte Mengen an Radioaktivität dieser Vorstufe.

Auf der Photoplatte eines im Trennsystem B gelaufenen Chromatogramms waren in beiden Medien zwei markierte Banden sichtbar, die in AM stärker geschwärzt waren.

Durch Ausheben der markierten und angefärbten Banden eines Parallelchromatogramms konnte bestätigt werden, daß die Banden von Zellen aus AM doppelt so hoch markiert waren wie in NM. Das Verhältnis in der Radioaktivität zwischen der oberen Bande, dem Phosphatidyläthanolamin und der unteren, nicht charakterisierten Bande, betrug 4 : 1 (Abb.3o).



Lipidextrakt von Zellen aus NM

Lipidextrakt von Zellen aus 1-AM-S

Abb.3o: Chromatographische Auftrennung eines Lipidextraktes von Zellen aus Normalmedium und 1-AM-S nach vorausgegangener Inkubation mit ^{14}C-Äthanolamin.

4. Diskussion

4.1. Vermehrung und Vitalität von EAT-Zellen in Normal- und Albuminmedium

Die Wachstumsrate von EAT-Zellen in Albuminmedium (Cohnfraktion V-Serva) lag in der 2.Passage in vitro nur bei 5o% derjenigen von Zellen in Normalmedium. Diese herabgesetzte Vermehrungsrate dürfte nicht die Folge eines Energiemangels sein, da die Glycolyserate der Zellen in Albuminmedium nur geringfügig niedriger, die Atmung der Zellen in beiden Medien aber gleich war.

Die Beobachtung, daß 88% des von Zellen in Albuminmedium innerhalb von 24 Stunden synthetisierten Proteins während der ersten 12 Stunden der Kultur synthetisiert werden, läßt vermuten, daß Zellen nach Umsetzen von serumhaltigem auf serumfreies Medium noch diejenigen Syntheseprozesse zu Ende führen, die durch Serumfaktoren in der vorangehenden Passage initiiert wurden. Auch dem Serum entnommene Reservestoffe könnten zu der beobachteten Zunahme der Zellzahl in Albuminmedium beigetragen haben. Die niedrige Totzahl der Zellen in serumfreiem Medium dürfte dem Effekt des Albumins zuzuschreiben sein. Besonders deutlich wird dieser Effekt an den, im Überstand verschiedener Kulturmedien gemessenen LDH-Aktivitäten. Während die Enzymaktivität im Überstand von Zellen in Normalmedium von 1o nach 24 Stunden gleich blieb, stieg sie im gleichen Zeitraum in den beiden Albuminmedien zwar um das 2-fache, bei Fehlen des Serums und Albumins aber um das 3.2-fache an.

Ein Vergleich der über die LDH-Aktivität und der über die Nigrosinfärbung ermittelten Zahl geschädigter Zellen macht deutlich, daß die Messung der Enzymaktivität ein empfindlicherer Parameter zur Beurteilung der Vitalität ist, da er alle lysierten, die Färbung mit Nigrosin aber nur die gerade defekt gewordenen Zellen erfaßt.

Als Ursache für die nach der 2.Passage in vitro abnehmende, dann aber konstant bleibende Vermehrungsrate von EAT-Zellen in Normalmedium werden in der Literatur Änderungen in der

Zellzyklusdauer, der Wachstumsfraktion, sowie Zellverluste (Woo und Mit. 1975) oder eine Akkumulation nichtzirkulierender Zellen in G1 infolge eines Inhibitors in Betracht gezogen (Barford und Bichel 1976). Eine Verlängerung der Zellzyklusdauer konnte bei den vorliegenden Versuchen anhand der cytophotometrischen Messungen für EAT-Zellen in Normalmedium nicht festgestellt werden, dagegen nahm die Totzahl der Zellen auch in diesem Medium im Verlauf mehrerer Passagen zu.

Die Vermehrungsrate der Zellen in Albuminmedium ging in der 3. und 4.Passage erheblich zurück, während die Totzahl parallel dazu anstieg. Gleichzeitig wurden bei diesen Zellkulturen, wie auch bei Zellen in serum- und albuminfreiem Medium während der 2.Passage in vitro, vereinzelt Zellhaufen oder unregelmäßig große Zellen beobachtet. Eine solche Bildung von Zellaggregaten in serumfreiem Medium wurde bereits von Knutson (1971) an Maussarkomazellen beobachtet. Zugabe von Serum redissoziierte diese Aggregate.

4.2. Albumin als"Wachstumsfaktor"

Zellwachstum, Vitalität und Syntheseleistungen der untersuchten EAT-Zellen in einem chemisch definierten Medium sind vom Reinheitsgrad der dem Medium hinzugefügten Albuminfraktion abhängig. So zeigten Zellen in Medium mit reinstem Rinderserumalbumin eine bis zu 6o% höhere DNA- und bis zu 8o% höhere Proteinbiosynthese als Zellen in Medium mit der Cohnfraktion V (Reinheitsgrad: 96%, Peters 1975). Daher darf, obwohl die Wachstumsrate der Zellen in Medium mit reinstem Rinderserumalbumin aufgrund eines vermehrt auftretenden Haftens der Zellen am Glas, nicht feststellbar war, auf eine ebenso hohe oder sogar höhere Vermehrungsrate wie sie Zellen in Medium mit der Cohnfraktion V zeigten, geschlossen werden. Durch Dialyse der beiden Albuminfraktionen wurde die Differenz hinsichtlich der Wirkung auf die Proteinbiosynthese verringert, jedoch blieb ein Unterschied weiterhin bestehen. Das bedeutet, daß das Albumin selbst oder kleine Mengen anderer, analytisch nicht mehr nachweisbarer Proteine, die

in der Albuminfraktion enthalten sind, zusätzlich zu den dialysierbaren Wachstumsfaktoren die Syntheseleistung der Zellen beeinflussen können.

Wilson und Foster (1971) isolierten aus Rinderserumalbumin geringe Proteaseaktivitäten, von denen bekannt ist, daß sie durch Abspaltung von Zelloberflächenproteinen (Hynes 1974) die Zelle aus einem Ruhe- in ein Proliferationsstadium führen und damit das Wachstum der Zelle aktivieren können.

Polet und Polet (1975 und 1976) behaupten, daß das Albumin selbst und nicht ein an dieses gebundener Faktor oder eine freie Fettsäure das Wachstum von Lymphocyten fördert. Sie konnten zeigen, daß sowohl mono- und dimeres Albumin wie auch Merkapto- und Nichtmerkaptoalbumin die gleiche Aktivität besaßen.

Höhere Wachstumsraten mit der Cohnfraktion V als mit kristallinem Rinderserumalbumin erhielten Birch und Pirt (1969) für Mäusefibroblasten. Zusatz von Natriumpyruvat und α-Ketoglutarat konnte den Effekt des kristallinen Rinderserumalbumins anheben aber nicht den der Cohnfraktion erreichen.

Yamane und Mit. (1975) sowie Banks und Mit. (1977) führen die wachstumsaktive Wirkung der Cohnfraktion auf die in dieser Fraktion enthaltenen Fettsäuren zurück. Durch Zusatz verschiedener, vorwiegend ungesättigter Fettsäuren wie Öl- und Linolsäure zu entfettetem Albumin, das selbst keinen Effekt zeigte, konnten sie die Wirkung von 1o% Kalbsserum auf das Wachstum von Melanoma und Yoshida Ascites Tumorzellen ersetzen.

Inwieweit die unterschiedlichen Syntheseleistungen unserer EAT-Zellen in Medium mit der Cohnfraktion V und reinstem Rinderserumalbumin auf deren Gehalt an freien Fettsäuren oder anderen Lipide zurückzuführen sind, läßt sich aufgrund der vorhandenen Analysendatenfür die verwendete Cohnfraktion V

nicht beurteilen. Sicher aber ist, daß dialysierbare Begleitsubstanzen dieser Fraktion (z.B. Glycoproteine, Hexosamine, Sialinsäure) (Healy und Perker 1966), die in reinstem Rinderserumalbumin nicht enthalten sind, ein Anhaften der Zellen am Glas verhindern können und zur verbesserten Membranstabilität beitragen.

Albuminfraktion unterschiedlicher Herkunft

Die Ursache für den unterschiedlichen Effekt der gleichen Albuminfraktion - Cohn V - verschiedener Herkunft (Serva und Roth) könnte in der Aufarbeitungsmethode und damit in der Reinheitsstufe beider Präparationen zu suchen sein. So wäre die geringere Wachstumsrate von Zellen in Medium mit der Cohnfraktion V von Roth durch eine Verunreinigung dieser Fraktion mit Spuren der Cohnfraktionen III und/oder IV zu erklären. Diese beiden Fraktionen führen nämlich zu einer Hemmung der Wachstumsraten von Lymphocyten (Polet und Spieker Polet 1975). Offensichtlich handelt es sich bei den wirksamen Komponenten um niedermolekulare Substanzen, da nach Zusatz der dialysierten Fraktion V von Roth die Zellen teilweise eine höhere Proteinbiosynthese zeigten als jene in Medium mit der dialysierten Cohnfraktion von Serva.

Albuminkonzentration

Obwohl die Adsorption von Albumin an die Asciteszelle sehr hoch ist, wird nur ein kleiner Teil des adsorbierten Albumins in die Zelle aufgenommen (Ryser 1962). Ein wesentlicher Effekt des Albumins auf die Zellen liegt somit in seiner membranstabilisierenden Wirkung, die bereits durch o.5% Albumin im Medium erreicht werden soll (Wernstedt und Mit.1975). Diese Konzentration ist für unsere Asciteszellen unter den verwendeten Kulturbedingungen nicht ausreichend, da bei dieser Albuminkonzentration der Anteil toter Zellen doppelt so hoch war wie bei höheren Konzentrationen.

Keinen oder nur einen geringen Einfluß hatte die Albuminkonzentration auf das Wachstum und die DNA-Synthese der Zellen,

dagegen war die Aufnahme von α-Aminoisobuttersäure bei der niedrigsten Albuminkonzentration vorübergehend geringer, der Einbau von ^{14}C-Leucin höher. Eine Erklärung für dieses Verhalten des Aminosäuretransports in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration des Mediums ist nur schwer möglich. Jedoch bestätigen Literaturbefunde, daß Zusatz von 1% Albumin den günstigsten Effekt auf das Wachstum und die Vitalität von Melanomazellen besitzt (Banks und Mit 1977). 1o mg Albumin/ml Kulturmedium entspricht in etwa der durch das Serum hineingebrachten Albuminmenge von 9mg/ml (Gospodarowicz und Moran 1976).

Albuminspecies

Der Ersatz des Serums durch 1% Humanserumalbumin verschiedener Fraktionen führte zur gleichen DNA-Syntheserate wie sie für Zellen in Medium mit der Cohnfraktion V aus Rinderserum beobachtet werden konnte. Jedoch wurde bei Verwendung dieser Fraktionen, im Gegensatz zur Cohnfraktion V, immer ein Haften der Zellen am Glas beobachtet.

Da Rinder- und Humanserumalbumin völlig identisch sind (Polet und Polet 1976), muß die Ursache für diesen Glaswuchs auch hier in den Begleitstoffen dieser Fraktionen zu suchen sein. Andererseits werden auch toxische Effekte von Humanserumalbuminfraktionen auf Asciteszellen diskutiert (Halaburt und Mit.1975).

Dialysierte Albuminfraktionen

Nach Zugabe dialysierter Albuminfraktionen zu serumfreiem Medium konnte die Proteinbiosyntheserate der Zellen erheblich, die DNA-Synthese gering gesteigert werden. Gleichzeitig verschwand der bei Zellen in Medien mit verschiedenen nichtdialysierten Cohnfraktionen beobachtete Vitalitätsunterschied. Jedoch wurde in jedem Medium mit dialysiertem Albumin ein ver-

mehrtes Haften der Zellen am Glas beobachtet. Die erhöhte Protein- und DNA-Synthese könnte durch aus der Albuminfraktion stammenden (Wilson und Foster 1971) oder durch Kontamination während der mehrtägigen Dialyse in das Medium gelangten proteolytischen Aktivitäten z.B. Mikroorganismen bedingt sein. Diese können Oligopeptide oder niedermolekulare Proteine freisetzen, die nicht vollständig ins Außendialysat gelangt waren und damit der Zelle als zusätzlicher Nährstoff zur Verfügung stehen. Diese Annahme wird gestützt durch frühere Versuche von Eagle (196o). Ihm gelang es, Zellen in einem chemisch definierten, proteinfreien Medium zu züchten, wobei dieses Medium über eine Dialysemembran mit einem zweiten Medium in Verbindung stand, das dialysiertes Serum sowie eine proteolytische Enzympräparation enthielt.

Schaer und Schindler (1967) stellten nach Zugabe von hydrolysiertem Rinderserumalbumin zu EAGLE-Medium fest, daß das Hydrolysat eine Reihe "wachstumsaktiver Komponenten" wie Natriumpyruvat, Nucleoside, Linolsäure, Insulin, Spermidin etc. ersetzen konnte und über 24 Stunden eine sehr gute Proliferation von Mastocyten zur Folge hatte.

4.3. Transport von Aminosäuren, Glucose und Cholin in Albuminmedien. Transport von α-Aminoisobuttersäure und Cycloleucin

Zwei Aminosäuretransportsysteme wurden in EAT-Zellen nachgewiesen (Christensen und Mit.1973; Stitzer und Mit.1975), das Na-abhängige A-System für neutrale und das Na-unabhängige L-System für verzweigtkettige und zyklische Aminosäuren. Ob zwei weitere Transportsysteme (ASC- und L^+-System) in diesen Zellen zu finden sind (Tupper und Mit.1976), und ob die Aufnahme der Aminosäuren ATP-abhängig ist (Geck und Mit.1974; Christensen und Mit.1973) oder an ein Redoxsystem gebunden ist (Garcia-Sancho 1977), geht aus der Literatur nicht eindeutig hervor. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Messung des A-Systems α-Aminoisobuttersäure, zur Messung des L-Systems Cycloleucin verwendet.

Für beide Aminosäuren zeigten EAT-Zellen in Normalmedium in allen Passagen in vitro einen gleichbleibenden zellzyklusabhängigen Transport.

Auffallend am Aminosäuretransport der Zellen in Albuminmedium war die gegenüber in Normalmedium erhöhte Aufnahme von Cycloleucin in der 2.Passage in vitro sowie die im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigten aber konstant bleibenden Transportraten für beide Aminosäuren in den weiteren Passagen. Es bestand somit keine Korrelation zwischen der kontinuierlich fallenden Vermehrungs- und Proteinbiosyntheserate und der Aufnahme von Aminosäuren.

Der erhöhte Transport von Cycloleucin in Zellen in Albuminmedium (Cohnfraktion V) läuft mit der über die Aminosäureanalyse ermittelten, gleichzeitig zu beobachtenden stärkeren Abnahme des Leucin- und Isoleucingehaltes in diesem Medium parallel.

Da bei Inkubation der Zellen in Albuminmedium mit markiertem Leucin dieses weder verstärkt in den Proteinen noch in den Lipiden erscheint, muß auf eine erhöhte Oxidation dieser Aminosäure geschlossen werden. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung von Neff und Mit.(1977),aus welcher hervorgeht, daß die Höhe des oxidativen Abbaus ketogener Aminosäuren in starkem Maße von der Komplexität des Kulturmediums abhängt. Zu einem ähnlichen Resultat kamen auch Lemonnie u. Mit. (1976), die den Verbrauch von AS in Fibroblasten untersuchten. Inwieweit Albumin oder andere Serumfaktoren (Etienne und Mit.1976) die Aminosäureaufnahme in die Zellen beeinflussen und über welchen Mechanismus dieses geschieht, ist noch weitgehend unklar. Serum und Wachstumsfaktoren sollen bevorzugt auf das A-System weniger auf das L-System wirken (Borghetti und Mit.1977). Dabei soll die Aufnahme direkt über die Aktivierung von "cryptic sites" oder "transport sites" (Plagemann und Richey 1974) oder über die Aufhebung einer negativen Kontrolle durch einen Zellfaktor (Bhargava und Vigier 1976) und indirekt über eine

stimulierte DNA-Synthese (Griffiths 1972) erfolgen. Die Bildung von Aminosäure-Membran-Komplexen wie sie verschiedentlich beschrieben wurde (Bondy und Harrington 1978; Adamson und Mit.1972) konnte bei Asciteszellen nicht beobachtet werden (Stitzer und Jaquez 1975).

Transport von 2-Desoxyglucose

Das Glucoseanaloge 2-Desoxyglucose (2-DG) wird durch das gleiche passive und Na^+-unabhängige System transportiert wie die D-Glucose. Da 2-DG nach Phosphorylierung durch die Hexokinase weder Substrat für die Glucose-6-P-Isomerase noch für die Glucose-6-P-Dehydrogenase ist, akkumuliert es in der Zelle (Walum und Edström 1976).

EAT-Zellen in Normalmedium zeigten einen zellzyklusunabhängigen mit jeder weiteren Passage in vitro leicht zunehmenden Glucosetransport. Ein Anstieg der Glucoseaufnahme mit der Länge der Kulturdauer konnte auch in Fibroblasten und Gliomazellen beobachtet werden, wobei Änderungen im "carrier mediated" Transport sowie in der passiven Diffusion von Glucose in die Zelle auftraten (Edström und Mit 1976). Die Ursache für einen zunehmenden Glucosetransport in Asciteszellen in Normalmedium könnte in einer Aktivierung des Pentose-Phosphat-Weges und damit in einer erhöhten de novo Synthese von Ribonucleosiden liegen (Renner und Mit.1972). Jedoch kann auch eine verstärkte glycolytische Aktivität (Bailey 1966) sowie eine zunehmende Lipidsynthese aus Glucose mit jeder weiteren Passage in vitro nicht ausgeschlossen werden (Welch und Mit.1977).

Daß der Zusatz von Serum zum Kulturmedium zu steigenden Transportraten für Glucose durch Erhöhung von Vmax (Km blieb konstant) führte, wurde bereits an mehreren Zellinien gezeigt (Sefton und Rubin 1971; Bradley und Culp 1974; Grimes und Schroeder 1973). Der Mechanismus dieses Prozesses ist ana-

log zum Aminosäuretransport, noch weitgehend unbekannt.

So soll der durch Serum aktivierte Glucosetransport primär auf einer Vermehrung der "transport sites" oder deren erhöhten Turnover (Dolberg und Mit.1975), einer veränderten Affinität der Transportproteine zur Glucose (Kletzien und Perdue 1974), auf Permeabilitätsänderungen der Membran (Walum und Edström 1976) oder sekundär auf einer veränderten Proteinbiosynthese beruhen (Sefton und Rubin 1971). Da die Proteinbiosynthese von Zellen in Albuminmedium innerhalb mehrerer Passagen in vitro durch einen Serummangel weit stärker beeinträchtigt wird als der in diesen Zellen gleichzeitig gemessene und über mehrere Passagen in vitro nahezu konstant bleibende Glucosetransport, können fehlende Transportproteine nicht die Ursache für die geringere Aufnahme von Glucose von Zellen in Albuminmedium sein. Vermutlich ist dieser,gegenüber Zellen in Normalmedium erniedrigte Glucosetransport, nur Ausdruck eines reduzierten Bedarfs infolge einer verringerten Stoffwechselaktivität.

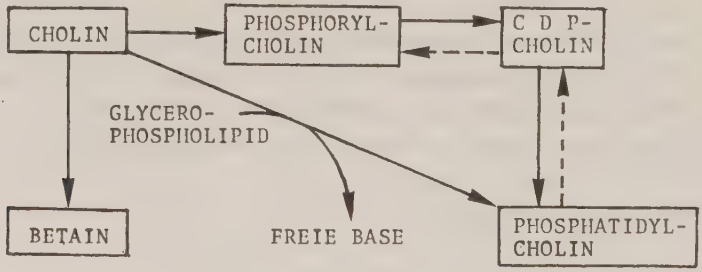
Aufnahme von ^{3}H-Cholin

Cholin ist als "Wachstumsfaktor" (Birch und Pirt 1969; Plagemann 1968) für nahezu alle Zelltypen unentbehrlich. Es gilt als spezifische Vorstufe für die Synthese von Membranphosphatidylcholin, das sowohl über den "Kennedy Pathway" (Plagemann 1968) wie auch über Basenaustausch (Treble und Mit.197o) entstehen kann. Außerdem kann Cholin oxidiert und zur Energiegewinnung herangezogen werden (Tyler 1977; Ridder 1976).

Wie aus unseren Versuchen hervorgeht, nehmen EAT-Zellen in Abwesenheit von Serum gegenüber den Kontrollkulturen in Vollmedium vermehrt Cholin auf. Da dieser Zellart ein Transportsystem für Cholin fehlt (Sung und Johnstone 1965), könnte diese verstärkte Aufnahme das Resultat einer höheren Diffusionsgeschwindigkeit infolge einer veränderten Membranpermeabilität oder auch eines erhöhten Bedarfs dieser Vorstufe für die Synthese von Membranbestandteilen sein. Erfolgt die

Synthese von Phosphatidylcholin in Asciteszellen über den "Kennedy Pathway", so kann sowohl eine Limitierung durch die Cholinkinase wie auch ein begrenzender Schritt zwischen Phosphorylcholin und Phosphatidylcholin ausgeschlossen werden (Plagemann 1968 und 1971; Infante 1977), da der Anteil markierten Cholins in der säurelöslichen wie in der säureunlöslichen Fraktion der Zellen in Normalmedium während der 2.Passage in vitro konstant blieb.

In Zellen in Albuminmedium wurde das vermehrt aufgenommene markierte Cholin in der säureunlöslichen Zellfraktion (Phosphatidylcholin) gefunden, während die Aktivität in der säurelöslichen Fraktion nur gering anstieg.



Metabolismus von exogenem Cholin (Sundler u.Mit.1972)

4.4. Biosynthese von Makromolekülen

RNA- und DNA-Synthese

Die Einbauraten von ^{14}C-Thymidin einerseits und ^{14}C-Uridin andererseits zeigten innerhalb mehrerer Passagen in vitro und in den verschiedenen Medien einen unterschiedlichen Verlauf, so daß trotz der Zusammenhänge von RNA- und DNA-Synthese hier verschiedene Einflüsse wirksam sein müssen.

Besonders auffallend war - bei normaler DNA-Synthese und einer Vermehrungsrate von über 5o% - der an Zellen in Normalmedium gemessene, kontinuierliche Abfall der Uridineinbauraten mit jeder weiteren Passage in vitro.

Geht man davon aus, daß Zellen in vivo (Mäuseperitoneum), bedingt durch den niedrigen Glucosegehalt der Ascitesflüssigkeit, Uridin nicht selbst synthetisieren, sondern dem Ascitesserum entnehmen und über den "Salvage Pathway" zu UTP phosphorylieren (Kummer 1964), so kann die Inkubation der Zellen in einem glucosereichen Medium die de novo Synthese dieses Nukleosids initiieren. Die Folge davon wäre eine Vergrößerung des endogenen Uridinnukleotidpools, der zu einer Verdünnung der markierten Vorstufen und somit zu einem geringeren Einbau von ^{14}C-Uridin in die RNA führen würde. Einige Autoren postulieren zwei verschiedene endogene Uridinnukleotidpools (Roux und Mit. 1977; Swierczewski und Roux 1977; Plagemann 1972), einen cytoplasmatischen, der 95% aller Nukleotide enthalten soll und einen kleineren nuklearen. Sollte die Asciteszelle ebenfalls über zwei endogene Pools verfügen, so dürfte neusynthetisiertes Uridin vorwiegend den cytoplasmatischen Pool speisen, da nur dieser beliebig zu vergrößern sein soll.

Nach Plagemann (1972) soll exogenes Uridin trotz hoher cytoplasmatischer Uridinnucleotidkonzentration direkt zum Kern transportiert, dort phosphoryliert und in die RNA eingebaut werden. Dieses scheint aufgrund der fallenden Einbauraten von Uridin für Asciteszellen nicht zuzutreffen. Es kann daher angenommen werden, daß sowohl exogenes wie endogenes Uridin in einem Pool landen.

Für die Umstellung von der Verwendung exogener Nukleoside auf die de novo Synthese benötigen synchronisierte Hamsterzellen einen Zellzyklus von 24 Stunden (Stambrook und Sisken 1972). Diese Zeitspanne scheint für Asciteszellen deshalb nicht ausreichend zu sein, weil es sich hierbei um eine asynchrone Zellpopulation handelt, die für eine Verdoppelung ihrer

Zellzahl mehr als 24 Stunden benötigt.

Bei den an Zellen in Albuminmedium in der 3. und 4. Passage in vitro gemessenen Uridineinbauraten kommt neben der Anpassung an das glucosehaltige Nährmedium durch Initiierung der endogenen Uridinsynthese noch der Effekt des fehlenden Serums hinzu. Es kann daher nicht geklärt werden, ob der kontinuierliche Abfall des Einbaus von exogenem Uridin auf Fehlen der für eine intakte RNA-Synthese notwendigen Serumfaktoren beruht, die Folge einer aktivierten endogenen Uridinsynthese oder das Ergebnis einer Kombination beider Faktoren ist. Da die Absolutwerte des Uridineinbaus von Zellen in Albuminmedium zwar abnehmen, die prozentualen aber höher liegen als aufgrund der Wachstumsraten zu erwarten wäre, darf eine, gegenüber Zellen in Normalmedium geringere Zunahme der endogenen Uridinproduktion angenommen werden, so daß diese Zellen stärker als jene in Normalmedium, auf exogene Vorstufen zurückgreifen müssen.

Die Ursache für das über mehrere Passagen in vitro gleichbleibende Verlaufsprofil des Thymidineinbaus für Zellen in Normalmedium scheint in einer "besseren" Regulation der DNA-Synthese zu liegen.

So sollen Aufnahme von Thymidin aus dem Medium, Aktivierung der Thymidinkinase und Einbau des Nukleotids in die DNA gekoppelt sein (Plagemann 1972; Müller und Mit.1964). Das bedeutet, daß nur dann, wenn DNA synthetisiert wird, exogenes von der Zelle aufgenommen bzw. endogenes von ihr produziert werden kann. Eine Vergrößerung des endogenen Nukleotidpools durch Eigensynthese des Nukleosids ist daher nur kurz vor und während einer aktiven DNA-Synthese und nicht wie für Uridin im Verlauf des gesamten Zellzyklus möglich (Nordenskjöld und Mit.197o). Das wiederum hat zur Folge, daß der Thymidinnukleotidpool während der Phase aktiver DNA-Synthese in allen Passagen etwa gleich groß ist, so daß die Menge an aufgenommenem markiertem Thymidin eine Aussage über die Aktivität der DNA-Synthese zuläßt.

Findet keine DNA-Synthese mehr statt, führt die vermehrte Produktion von TDP und TTP über eine Endprodukthemmung der Thymidinkinase zu einer Verminderung der Thymidinphosphorylierung des "Salvage Pathway" (Ives und Mit.1962; Kummer 1969) und damit auch zu einer abnehmenden Inkorporation von markiertem Thymidin in die säureunlösliche Zellfraktion.

Die DNA-Synthese ist nach der Proteinbiosynthese diejenige Stoffwechselleistung der Zellen, die durch Abwesenheit des Serums sehr schnell und sehr stark herabgesetzt wird. Aufgrund dieser Beobachtung ist nicht auszuschließen, daß die verringerte DNA-Synthese ein Sekundäreffekt von "fehlenden nichtsynthetisierten Proteinen" ist, die als Transportproteine für die Aufnahme von Nukleosiden aus dem Medium erforderlich sind (Plagemann 1974). Dagegen vermuten Okuda und Kimura (1978) einen direkten Einfluß von makromolekularen Serumfaktoren auf die Aufnahme von Nukleosiden und auch anderer niedermolekularer Nährstoffe, die für den Eintritt der Zellen in die S-Phase und damit für eine beginnende DNA-Synthese notwendig sind.

Nordenskjöld und Mit.(197o)stellten in Abwesenheit von Serum eine verminderte Aktivität der Ribonukleotid-Reduktase und Thymidinkinase fest, woraus eine ebenfalls verminderte DNA-Synthese resultierte.

Vorliegende Messungen der DNA- und RNA-Synthese bestätigen die Erkenntnis anderer Autoren, wonach der Einbau von markiertem Uridin in die säureunlösliche Zellfraktion keineswegs als zuverlässiges Maß der RNA-Synthese angesehen werden darf (Yost und Mit. 1976; Hausen und Stein 1968; Petz 1971), der von markiertem Thymidin aber eine Aussage über die DNA-Synthese erlaubt.

Proteinbiosynthese

Auf Serumentzug reagierten EAT-Zellen sofort mit einer verringerten Proteinbiosynthese, so daß die von diesen Zellen innerhalb von 24 Stunden synthetisierte Proteinmenge nur bei 5o % derjenigen von Zellen in Normalmedium lag.

Kaminskas (1973), der die gleiche Beobachtung an Asciteszellen machte, stellte parallel zur reduzierten Proteinbiosynthese eine verringerte Polysomenbildung fest, die nach Serumzufuhr wieder aktiviert werden konnte (Kaminskas 1972).

Dieser Effekt war weder einem veränderten "energy charge" (Kaminskas 1974) noch kleinen Regulatormolekülen wie dem c-AMP zuzuschreiben (Kaminskas 1976) sondern in dem Fehlen makromolekularer, durch Trypsin inaktivierbarer Serumfaktoren begründet (Kaminskas 1975). Diese Faktoren sollen über Interaktion mit spezifischen Membranrezeptoren und anschließender Aufnahme durch die Zelle die Proteinsynthese initiieren (Singer und Mit.1972; Kaminskas 1975).

Bei näherer Untersuchung des Mechanismus der Polysomenbildung stellten Pain und Henshaw(1975)fest, daß die Bildung des Met--t-RNA 4o-S Komplexes der regulatorische Schritt für die Initiierung der Translation - als Reaktion auf eine veränderte Medienzusammensetzung - ist. Zum gleichen Resultat kommen auch Hassell und Engelhardt(1976)bei Untersuchungen der Proteinbiosynthese von Verozellen in serumfreiem Medium. Sie vermuten eine translationale Kontrolle durch die regulierende Aktivität des Elongationsfaktors I (EFI).

Ob es sich um nur einen oder um mehrere Initiationsfaktoren handelt (Schreier und Staehlin 1973), ob diese mit einer Serumkomponente identisch sind oder ob letztere über einen "pleiotypic mediator" z.B.c-AMP die Proteinbiosynthese wie auch die Synthese anderer makromolekularer Zellbestandteile aktivieren, ist noch ungeklärt (Freilin und Padieu 1976; Jones und Addison 1976; Meedel und Levine 1978).

4.5. Variierte Albuminmedien

4.5.1. Einfluß von Polyaminen

Wider Erwarten konnte nach Zufuhr von exogenem Spermidin und Poly-L-Lysin zu Normal- und Albuminmedium kein Wachstumsanstieg der in diesen Medien gezüchteten EAT-Zellen beobachtet werden, vielmehr wurde eine Hemmung der Zellvermehrung von

EAT-Zellen durch Polyamine in Normalmedium festgestellt.

Israel und Mit.(1965), die ähnliche Beobachtungen machten, erklärten diesen Hemmeffekt mit einer Oxidation der Polyamine zu den entsprechenden Mono- und Dialdehyden durch die im Kalbsserum enthaltenen Aminoxydasen. Da diese Enzyme im Pferde- und Humanserum fehlen (Clo und Mit. 1976), aber in Rinderserumalbumin nachgewiesen werden konnten (Tabor und Tabor 1976), können Oxidationsprodukte zumindest nicht für die Wachstumshemmung von EAT-Zellen durch Polyamine in Normalmedium verantwortlich sein.

Andererseits ist aus der Literatur bekannt, daß die durch die Ornithindecarboxylase synthetisierten Amine eine Produkthemmung bewirken und damit die Synthese weiterer Amine verhindern und die DNA-Synthese und Zellproliferation beeinflussen. Dieser Mechanismus wurde durch Zugabe verschiedener Polyamine, vorwiegend in höheren Konzentrationen, zu Zellkulturen vielfach demonstriert (Kay und Lindsay 1973; Theorharides und Canellakis 1975). Auch an EAT-Zellen, die reichlich Polyamine enthalten sollen (Bachrach 1976), rufen unphysiologische Amine (Diaminopropan, Diaminohexan, Cadaverin) eine Hemmung der Ornithindecarboxylase und damit verbunden eine gleichzeitige Abnahme von Spermidin und Spermin hervor(Kallio und Mit.1977). Nach Anderson (1977) können auch von der Zelle selbst produzierte und in das Medium abgegebene Amine die endogene Polyaminsynthese stillegen.

Obwohl der Anstieg der Amine synthetisierenden Enzyme, die Zunahme des Polyamingehaltes in der Zelle und die einsetzende DNA- und RNA-Synthese parallel oder nur mit geringer Verzögerung ablaufen, gibt es dennoch bisher keinen konkreten Hinweis für eine direkte Kontrolle der Nukleinsäuresynthese durch Polyamine (Tabor und Tabor 1976).

Das bei Zugabe von Spermidin und Poly-L-Lysin zum Nährmedium verstärkt auftretende Anhaften der Zellen an der Glasunterlage beruht auf einer Reduzierung der elektrophoretischen Mobilität der Zellen (Halle 1976). Diese ist ein Maß für die Zelloberflächenladungsdichte, die wesentlich bestimmt durch den Gehalt an Neuraminsäuren, reich an anionischen Gruppen ist. Polykationische Polymere wie das Poly-L-Lysin reduzieren die negativen Ladungen signifikant - wahrscheinlich durch die Bindung an die Zelloberfläche - und vermitteln dadurch das Anheften der Zellen an die in neutralen Salzlösungen schwach negativ geladene Glasoberfläche.

4.5.2. Einfluß von Spurenelementen, Fe, Vitaminen und Insulin

Eine große Zahl verschiedener Zellstämme stimmt, sofern sie in serumhaltigem Medium gezüchtet werden, in ihren qualitativen Nährstoffbedürfnissen weitgehend überein. Jedoch fällt auf, daß für einige Zelltypen, insbesondere für solche, die in einem chemisch definierten, serumfreien Medium wachsen, ein erhöhter Bedarf für anorganische Komponenten und Vitamine besteht.

So zeigen Befunde aus der Literatur, daß die Zugabe solcher Ionen ins Medium das Wachstum und die Verdoppelungszeit einiger Zellinien in serumfreiem Medium günstig beeinflußten (Thomas und Johnson 1967; Birch und Pirt 197o). Folglich wurden anorganische Komponenten wie Fe^{++}, Cu^{++}, Mn^{++} (Takaoka und Katsuta 1971) und Zn^{++} (Birch und Pirt 197o) sowie verschiedene Vitamine den Medien bereits prophylaktisch hinzugesetzt (Higuchi 197o; Nagle und Mit.1963).

Für das Wachstum von Asciteszellen in Albuminmedium waren sowohl die Ionen Fe^{++}, Cu^{++} und Mn^{++} wie auch die Vitamine Ascorbinsäure und Cobalamin ohne Effekt. Dies könnte bedeuten, daß diese Metallionen und Vitamine durch die Rinderserumalbuminfraktion mit in das Medium hineingebracht wurden.

Für Insulin ist eine Stimulierung der Glykolyse (Crockett und Leslie 1963) und in verschiedenen Fällen eine wachstumsfördernde Wirkung entweder von Insulin selbst (Leslie und Mit.1956) oder eines Protamin-Zn-Insulin Komplexes (Blaker und Mit.1971) an verschiedenen Zellkulturen beschrieben worden. Auf Asciteszellen in Normal- und Albuminmedium blieb der Zusatz von Insulin jedoch ohne Effekt. Die gleiche Beobachtung machten Birch und Pirt (197o) an Kulturen von Mäusefibroblasten.

4.5.3. Einfluß des pH-Wertes des Mediums

Ob der physiologische pH-Bereich von 7.4 bis 7.6 auch bei EAT-Zellen in Albuminmedium zur maximalen Vermehrungsrate führt, und inwieweit sich eine pH-Verschiebung auf das Wachstum (z.B. durch einen verminderten Glaswuchs) auswirken könnte, sollte die Kultivierung von Zellen in Medien unterschiedlichen pH-Wertes klären.

Die Ergebnisse bestätigen, daß auch in Albuminmedium ein pH-Wert von 7.5, im Vergleich zu Medien mit den Anfangs-pH-Werten von 7.2, 7.8 und 8.o zu den höchsten Vermehrungsraten der Zellen führte. Die DNA-Synthese der Zellen fiel bei pH 7.2 gering, bei pH 7.8 und 8.o stark gegenüber den Kontrollen bei pH 7.5 ab und korrelierte mit den gleichzeitig gemessenen Vermehrungsraten. Die auch an anderen Zellen (Fibroblasten, Embryonalzellen) beobachtete reduzierte DNA-Synthese bei suboptimalem pH-Wert des Mediums soll auf einer Verlängerung der G1-Phase der Zellen beruhen (Fodge und Rubin 1973). Eine Abnahme der Vermehrungsrate bei pH-Werten des Mediums über 7.6 beobachtete auch Rubin (1974) an Hühnerembryonalzellen. Die gleichzeitige Zunahme des ^{14}C-Thymidineinbaus dieser Zellen mit steigendem pH-Wert führte er auf eine Permeabilitätsänderung und eine nur dadurch bedingt erhöhte Aufnahme dieses Nukleosids in die Zelle zurück.

Bereits Kavanau (1965) wies auf eine mögliche Änderung der Ionenverteilung und der Permeabilität der Zellmembran als Reaktion auf die extrazelluläre Protonenkonzentration hin.

Zusätzlich soll die Aggregation der auf der Zelloberfläche befindlichen Glykoproteine pH-empfindlich und damit an der Wachstumsregulation der Zellen beteiligt sein (Gottschalk 1966; Burger 1971).

Die Vitalität von EAT-Zellen in Albuminmedium war in alkalischem Medium (pH 7.8 und 8.o) gegenüber den Kontrollen bei pH 7.5 herabgesetzt, obwohl der pH-Wert des Mediums nach 24 Stunden auf den physiologischen pH-Wert von 7.5 gefallen war. Damit sind EAT-Zellen gegenüber einer Verschiebung ins Alkalische empfindlicher als Normalzellen (Fodge und Rubin 1973), während bei pH-Werten unter 7.o Vitalität und Wachstum kaum beeinträchtigt werden.

Die beobachtete zunehmende Laktatproduktion von EAT-Zellen in Albuminmedium im pH-Bereich von 7.2 bis 7.8 bestätigt das Ergebnis von Wilhelm und Mit.(1971), die an der gleichen Zellart eine maximale Laktatproduktion bei pH 7.4 bis 7.6 messen konnten. Die Verfasser schließen daraus auf eine Beeinflussung der Glykolyse durch den exogenen pH-Wert auf der Stufe der Phosphofructokinase.

Unterschiedliche Meinungen bestehen hinsichtlich der Wirkung des Serums auf die Reaktion der Zellen gegenüber extrazellulären pH-Verschiebungen. Von Ceccarini und Mit.(1971) wird betont, daß dem Serum bei pH-Verschiebungen keine Bedeutung zukommt, wohingegen von Rubin (1971) auf die Funktion der Serumproteine bei pH-Verschiebungen des Mediums hingewiesen wird.

Daß dem Serum zusätzlich zu dem im Medium vorhandenen Bikarbonat eine Rolle als Puffersubstanz zukommt, zeigte der unterschiedliche Abfall des pH-Wertes in Normal- und Albuminmedium nach 24-stündiger Inkubation mit Zellen. Um den starken pH-Abfall in Albuminmedium zu vermindern, wurde den Zellkulturen in Albuminmedium HEPES (Endkonzentration: 2o mM) hinzugefügt. In dieser Konzentration war die Puffersubstanz ohne Einfluß auf das Wachstum von EAT-Zellen in Normal- und Albuminmedium. Für eine Reihe weiterer Säugerzellen wird dieses auch von Eagle (1971) berichtet, der darüber hinaus für eine

Konstanterhaltung des pH-Wertes in Zellkulturen die Verwendung von mehreren Puffersubstanzen in Kombination mit Phosphat und Bikarbonat empfiehlt.

4.6. Änderungen im Lipidstoffwechsel von EAT-Zellen bei Serummangel

Werden EAT-Zellen über längere Zeit in vitro gezüchtet, so zeigen sie eine zunehmende Akkumulation von Lipiden, deren Höhe von der Anwesenheit des Serums im Nährmedium bestimmt wird. Eine solche Ansammlung von Lipiden könnte für die sinkenden Vermehrungsraten der Zellen in Normalmedium in der 3. und 4.Passage in vitro verantwortlich sein. Unklar ist, ob diese Lipidanreicherung die Folge einer erhöhten Lipidsynthese, einer reduzierten Lipolyse oder das Resultat beider Möglichkeiten ist. Jedoch kann die Akkumulation von Lipiden in EAT-Zellen in Normalmedium und durch die Aufnahme exogener Lipide bedingt sein (Welch und Wood 1977; Bailey 1966), wohingegen Zellen nach dem Umsetzen von serumhaltigem auf serumfreies und damit lipidarmes Medium vorwiegend auf die de novo Synthese von Lipiden angewiesen sind. Offensichtlich ist dann in diesen Zellen eine gewisse Anpassungsphase an die neue Situation - z.B. durch die Bereitstellung der für die Lipidsynthese erforderlichen Enzyme - notwendig, da am Ende der 1.Passage in Albuminmedium noch keine, am Ende der 3.Passage eine Zunahme der Totallipide der Zellen um 35% festgestellt wurde.

Im Gegensatz zu Befunden aus der Literatur, die von erhöhten Einbauraten für Acetat in Fibroblasten in Abwesenheit von Serum (Puffer) (Bailey 1966) oder für WI-38 Zellen in lipidfreiem Medium (Howard und Mit.1976) berichten, lag der Acetateinbau in die Totallipide von EAT-Zellen in Albuminmedium nur bei 50% desjenigen von Zellen in Normalmedium. Es darf daher angenommen werden, daß Serumfaktoren direkt oder indirekt - z.B. über eine Regulation der Aufnahme von Acetat in die Zellen - auch für die Lipidsynthese aus Acetat von Bedeutung sind. Die Beobachtungen, daß auch bei Zellen in Normalmedium nur ein sehr geringer Teil des angebotenen Acetats in den Totallipiden erscheint, wofür die geringe Thiokinaseaktivität

dieser Zellen verantwortlich gemacht wird (Hepp und Mit.1966), schloß die Verwendung von Acetat als Substrat zur Messung der Lipidsynthese für weitere Versuche aus.

Ob EAT-Zellen in serumfreiem Medium Glucose oder Aminosäuren als Substrate für die Lipidsynthese heranziehen, ist nicht sicher, sondern kann nur als Folge der - im Vergleich zum Wachstum dieser Zellen - relativ erhöhten Transportraten für beide Substrate vermutet werden.

Jedoch dürfte den in der Cohnfraktion enthaltenen, freien Fettsäuren, die an Albumin gebunden für die Zelle gut verfügbar sind (Paris und Mit.1978, Spector 1975), eine Bedeutung für die endogene Lipidsynthese zukommen.

Stärker als in Zellen in Normalmedium nimmt das Cholesterin in Zellen in Albuminmedium im Verlaufe mehrerer Passagen zu. Hierbei muß es sich um eine echte Neusynthese von Cholesterin handeln, da diesen Zellen kein exogenes Cholesterin zur Verfügung steht. Die Frage, ob die Zunahme von intrazellulärem Cholesterin das Ergebnis einer fehlenden Exkretionsmöglichkeit aufgrund nicht vorhandener Serumproteine in chemisch definiertem Medium ist (Bailey 1965), oder einen erhöhten Bedarf an Cholesterin für die Synthese oder den Umbau von Membranen wiederspiegelt (Alivasatos und Mit. 1977; Rose 1977), kann z.Zt. noch nicht beantwortet werden.

Obwohl Zellen in serumfreiem Medium aufgrund ihrer, gegenüber Zellen in Normalmedium geringeren Wachstumsraten, auch einen herabgesetzten Bedarf an Membrankomponenten wie Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin haben sollten, wurden bei Pulsmarkierung mit ^{3}H-und ^{14}C-Cholin oder ^{14}C-Äthanolamin am Ende verschiedener Passagen in vitro, in der Totallipidfraktion von Zellen in Albuminmedium höhere Aktivitäten gefunden als in derjenigen von Zellen in Normalmedium. Die Ursache für das verstärkte Auftreten markierter Basen, vorwiegend in den Phospholipiden Phosphatidylcholin und -äthanolamin kann

- eine verstärkte de novo Synthese
- ein erhöhter Auf- und Abbau dieser Phospholipide oder

- ein beschleunigter Austausch phospholipidgebundener Basen durch markiertes Cholin sein.

Wie Ergebnisse aus der Literatur zeigen, nehmen verschiedene Zelltypen exogene Phospholipide auf (Howard und Howard 1975, Bailey 1959). Sollte die Asciteszelle in Normalmedium ihren Phospholipidbedarf ebenfalls durch Serumlipide decken, so ist sie in Albuminmedium ausschließlich auf die Neusynthese dieser Phospholipide angewiesen, wobei sie exogene Vorstufen verstärkt verwenden wird.

Eine weitere Erklärung für den erhöhten Einbau von markiertem Cholin und Äthanolamin in die Phospholipide von EAT-Zellen in Albuminmedium wäre ein schnellerer Auf- und Abbau dieser Phospholipide. Obwohl von einem solchen erhöhten Turnover der Phospholipide - insbesondere für Phosphatidylcholin - an verschiedenen Zelltypen in vivo (Jobe 1977; Zilversmit und Hughes 1977) und in vitro (Hirschberg 1977) berichtet wird, spricht der mit Fibroblasten (Peterson und Rubin 1969) und mit EAT-Zellen (Schneider 1977) gewonnene Befund, daß nur mit zunehmender Serumkonzentration des Mediums der Turnover für Phosphatidylcholin ansteigt, gegen diese Erklärung.

Auch die Beobachtung Cunninghams (1972), daß nichtwachsende gegenüber schnellwachsenden Zellen eine verlangsamte Abbaurate für Phosphatidylcholin zeigen, schließt einen erhöhten Turnover der Phospholipide in Asciteszellen in Albuminmedium aus.

Die 3.Möglichkeit wäre ein zunehmender Austausch phospholipidgebundener Basen durch exogenes, markiertes Cholin (Sundler und Mit.1972; Treble und Mit.197o). Für einen solchen Basenaustausch spricht die schnell zunehmende Markierung von Phosphatidylcholin innerhalb einer kurzen Inkubationszeit (2o min) und der konstant bleibende und im Vergleich zu den Totaleinbauraten relativ geringe Anteil markierter Vorstufen in der säurelöslichen Zellfraktion.

Es darf angenommen werden, daß die "neu" gebildeten Phospholipide aber zur Reparatur von Membranstrukturen als zu deren Neusynthese herangezogen werden, da die Wachstumsrate für Zellen in Albuminmedium mit zunehmender Passage in vitro ab-, die Totzahl in diesen Kulturen zunimmt. Ferner ist auch eine Umverteilung der verschiedenen Phospholipide in der Membran als Folge des Serummangels denkbar. Diese kann zu einer veränderten Membranfunktion wie auch zu einer Veränderung der Membranstabilität der Zellen führen (Glaser 1974; Koizumin und Mit.1977; Rose 1977).

Offen bleibt die Frage, in welchem Ausmaß die verschiedenen subzellulären Membranstrukturen von einem Serummangel betroffen und hinsichtlich ihrer Phospholipidzusammensetzung verändert werden.

4.7. Vergleich des Einflusses von Kalbs- und Pferdeserum auf die Syntheseleistungen von EAT-Zellen

Um den Einfluß der Serumart auf das Wachstum von EAT-Zellen festzustellen, wurden die Zellen in Parallelkulturen über zwei Passagen in vitro in dem üblichen Medium mit Pferdeserum und in Medium mit 1o% Kalbsserum gezüchtet.

Dabei zeigte sich, daß die Kultivierung der Zellen in Medium mit Kalbsserum, gemessen an der Vermehrungsrate, am Aminosäuretransport, an der Protein- DNA- und RNA-Synthese zu einer verzögerten Proliferation und zu verminderten Syntheseleistungen makromolekularer Zellbestandteile führte, auch dann, wenn die Zellen wieder auf Medium mit Pferdeserum umgesetzt wurden. Da beide Seren weder dialysiert noch hitzevorbehandelt waren, können sowohl hoch- wie niedermolekulare Serumkomponenten für die unterschiedlichen Vermehrungs- und Syntheseraten der Zellen in den beiden Medien verantwortlich sein. Daß beide Stoffklassen für ein optimales Wachstum von EAT-Zellen unentbehrlich sind, wurde von Schindler (1959) bereits gezeigt und durch unsere Versuche mit dialysiertem Pferdeserum bestätigt.

Der unterschiedliche Effekt der beiden Seren auf die Vermehrungsrate der EAT-Zellen in Suspensionskultur dürfte darauf beruhen, daß Pferdeserum spezifische Bestandteile enthält, die im Kalbsserum nicht vorhanden sind und die speziell von EAT-Zellen zur Erreichung hoher Vermehrungsraten benötigt werden. Diese Vermutung wird durch die Versuche von Ohta und Mit.(1969) bestätigt, die bei Verwendung verschiedener Seren ebenfalls zu unterschiedlichen Wachstumsraten der Ascites Hepatomazellen gelangten. In geringerem Maße könnten jedoch auch Faktoren wie Zustand des Spendertieres (Alter, Geschlecht, Versuchs- oder Nutztier, Ernährungszustand), Methode der Serumaufarbeitung, Lagerbedingungen und -dauer zu einer unterschiedlichen Serumqualität führen (Honn und Mit.1975; Boone und Mit.1972). Erkennbare "serumabhängige" Wachstumsschwankungen von EAT-Zellen in Gegenwart von Pferdeserum traten bei den vorliegenden Untersuchungen nur dann auf, wenn lysierte Erythrocyten bei der Aufarbeitung vermehrt ins Serum gelangt waren. Hämolytisches Serum führte im allgemeinen zu besseren Vermehrungsraten der EAT-Zellen.

4.8. Veränderungen der Stoffwechselaktivitäten von EAT-Zellen im Hinblick auf den Zellzyklus

Da es sich bei den für unsere Versuche verwendeten EAT-Zellen um asynchrone Zellpopulationen handelt, ist eine Zuordnung der gemessenen maximalen Transport- und Syntheseraten zu den einzelnen Zellzyklusphasen nur bedingt möglich. Grundsätzlich ist bekannt, daß sich die Stoffwechselaktivitäten innerhalb der verschiedenen Zellzyklusphasen ändern. Lediglich bei den Transportsystemen kann zwischen zellzyklusabhängigen und zellzyklusunabhängigen Systemen unterschieden werden. Zur ersten Gruppe gehören die Transportsysteme für die beiden Aminosäuren Aminoisobuttersäure und Cycloleucin, die innerhalb eines Zellzyklus das mehrfache ihrer zu Beginn der Kultur gemessenen Aktivität erreichen können und damit metabolisch "labil" sind, zur zweiten Gruppe die Transportsysteme für Glucose und Cholin, die keine Zellzyklusabhängigkeit aufweisen und als metabolisch "stabil" bezeichnet werden (Plagemann u.Mit.1975).

Versucht man, die gemessenen maximalen Transport- und Syntheseraten in die einzelnen Zellzyklusphasen einzugliedern, so liegt der maximale Aminosäuretransport bereits in der G1-Phase der Zellen. Die maximale DNA-Synthese erfolgt nach 12-stündiger Kulturdauer, die maximale RNA-Synthese zwischen 12 und 18 Stunden, wenn das G2/G1-Verhältnis nahezu seinen Höchstwert erreicht hat.

Während die Maxima der verschiedenen Stoffwechselaktivitäten der Zellen in Normal- und Albuminmedium in der 2.Passage in vitro zeitlich noch übereinstimmen, kann nach Beendigung des ersten Zellzyklus der Zellen in Albuminmedium eine verlängerte lag-Phase beobachtet werden. Diese kommt in einem verzögerten Anstieg des G2/G1-Verhältnisses in der 3.Passage in vivo zum Ausdruck und deutet, wie die gleichzeitig in dieser Passage auftretende Verschiebung der Aminosäuretransportmaxima auf eine verzögerte Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen in Albuminmedium hin. Aufgrund von Befunden aus der Literatur darf ferner angenommen werden, daß bei Serummangel ein Teil der Zellpopulation in G_0 bzw. G_1 liegen bleibt (Thomas 1977; Brooks 1976).

4.9. Vergleich der Wachstumsraten von EAT-Zellen bei kontinuierlicher und diskontinuierlicher Bewegung der Zellkulturen

Ziel der kontinuierlichen Bewegung der Zellkulturen war es, durch eine gleichmäßigere Nährstoffversorgung der Zellen zu höheren Wachstumsraten zu gelangen und bei Zellen in Albuminmedium das Haften an der Glasunterlage zu verhindern. Wie die Ergebnisse zeigen, konnte durch eine kontinuierliche Drehung der Kulturflaschen der Glaswuchs der Zellen in Albuminmedium nicht verhindert, die durchschnittliche Vermehrungsrate der Zellen in Normalmedium kaum und die der Zellen in Albuminmedium nur in einigen Fällen, wenn keine Koagulation der Zellen eingetreten war, angehoben werden.

Die Laktatproduktion und der Glucoseverbrauch von Zellen in Normalmedium waren bei kontinuierlicher Bewegung der Kulturen etwas niedriger als in jenen Kulturen, die im Abstand von zwei Stunden geschüttelt wurden. Daraus kann geschlossen werden, daß letztere nach der kurzen Bewegung der Kulturflasche bald in eine partielle Anaerobiose geraten und stärker glycolysieren.

Die häufig beobachtete Koagulation der Zellen in Albuminmedium bei permanenter Bewegung der Zellkulturen weist darauf hin, daß die physikalisch chemische Schutzwirkung von 1o mg Albumin/ml Medium auf die Zellmembran von EAT-Zellen bei kontinuierlicher Bewegung nicht ausreichend ist. Der Versuch, durch eine diskontinuierliche, aber häufigere Bewegung der Kulturen - die Flaschen wurden im Abstand von 3o min für 2 min gedreht - sowohl die Koagulation der Zellen zu verhindern als auch eine gute Durchmischung des Nährmediums zu gewährleisten, führte zu verringerten Wachstumsraten sowohl in Normal- als auch in Albuminmedium.

5. Zusammenfassung

1. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist das Studium von Zellproliferation und Stoffwechselleistungen von normalerweise in pferdeserumhaltigen Suspensionskulturen züchtbaren EAT-Zellen in serumfreien, chemisch definierten Medien.

2. EAT-Zellen in serumfreiem Albuminmedium zeigen nur noch für einige Stunden mit Zellen in serumhaltigem Medium vergleichbare Stoffwechselaktivitäten, wobei Zeitpunkt und Stärke des Abfalls der Syntheseleistungen variieren.

   In Abwesenheit von Serum und Albumin sinken alle Syntheseleistungen sofort, Untersuchungen an Zellen in Pufferlösung sind damit prinzipiell nicht mit solchen in serumhaltigen Kulturmedien vergleichbar.

3. Reinstes Rinderserumalbumin führte zu den höchsten Einbauraten für (^{14}C) Thymidin, (^{14}C) Uridin, (^{14}C) Leucin und (^{14}C) Lysin, gleichzeitig aber zu einem starken Haften der Zellen am Glas, so daß dieses Albumin ungeeignet war. Für alle permanenten Kulturen wurde daher die Cohnfraktion V von Serva verwendet, bei der der Glaswuchs sich in Grenzen hält.

   Die Ursache des unterschiedlichen Effektes der gleichen Cohnfraktion verschiedener Herkunft ist wahrscheinlich in niedermolekularen Begleitstoffen der Fraktion zu suchen.

4. Bei etwa gleicher Vermehrungsrate zeigen EAT-Zellen in Medium mit verschiedenen Albuminkonzentrationen geringe Unterschiede im Aminosäuretransport, der DNA- und Proteinsynthese. Die Totzahl ist bei der niedrigsten Albuminkonzentration (0.5%) erhöht.

5. Unterschiedliche Konzentrationen von Polylysin blieben ohne Wirkung auf das Wachstum von Zellen in Albuminmedien, setzten die Vermehrungsrate von Zellen in Normalmedium dagegen herab. Zusätzliche Ionen, Vitamine und Insulin im Albuminmedium beeinflußten das Wachstum der Zellen nicht.

6. Der physiologische pH-Bereich (7.2 - 7.4) erwies sich auch als optimal für das Wachstum und die DNA-Synthese von Zellen in Albuminmedium. Vermehrung und Vitalität der Zellen werden bei Erniedrigung des pH-Wertes des Mediums weniger beeinträchtigt als bei Erhöhung.

7. Die Dialyse der Albuminchargen zeigt, daß niedermolekulare Begleitstoffe für die unterschiedlichen Effekte der verschiedenen Albumine auf die gemessenen Parameter verantwortlich sind. Die erhöhte Protein- und DNA-Synthese der Zellen bei Zusatz von dialysiertem Albumin zum Medium wird möglicherweise durch bei der Dialyse entstandene Hydrolyseprodukte des Albumins verursacht.

8. Die Pufferkapazität des Serums in Normalmedium kann in Albuminmedium durch HEPES ersetzt werden. Diese Puffersubstanz hat auf das Wachstum der Zellen keinen Einfluß und stabilisiert den pH-Wert des Mediums über längere Zeit.

9. EAT-Zellen benötigen sowohl die hoch- wie niedermolekularen Komponenten des Pferdeserums. Verwendung von dialysiertem Serum senkte die DNA- und RNA-Synthese der Zellen. Der Ersatz des Pferdeserums durch Kalbsserum hatte eine geringere Vermehrungsrate und bezüglich der Transportraten für Aminosäuren der DNA- und Proteinsynthese ein leicht verändertes Verlaufsprofil der gemessenen Parameter zur Folge. Die Aufnahme von Uridin war in beiden Medien gleich.

1o. Die Züchtung von EAT-Zellen in Albuminmedium über mehrere Passagen in vitro führte

   a) zu abnehmenden Vermehrungsraten bei einem gleichzeitigen Anstieg der Totzahl auf 3o % nach der 3. Passage,

b) zu einer relativ geringen Abnahme der Transportraten für Aminosäuren und Glucose, aber zu einem Anstieg der Cholinaufnahme auf das 7-fache der Kontrolle,

c) zu einer herabgesetzten Syntheserate aller makromolekularen Komponenten. Der ebenfalls bei Zellen in Normalmedium beobachtete Abfall des Uridineinbaus ist wahrscheinlich Folge einer erhöhten endogenen Nucleosidsynthese,

d) zu einer Verlangsamung der Zellproliferation. Diese kommt in einer zeitlichen Verschiebung verschiedener Transportmaxima sowie in verringerten Syntheseleistungen der Zelle zum Ausdruck.

11. Zellen in Normal- und Albuminmedium reichern innerhalb mehrerer Passagen in vitro Lipide an. Dabei sind die Gesamtlipide von Zellen in Albuminmedium gegenüber der Kontrolle erniedrigt, der Cholesteringehalt erhöht. Der Einbau von Acetat in die Lipide von Zellen in Albuminmedium liegt bei 5o% desjenigen von Zellen in Normalmedium.

12. Exogenes Cholin und Äthanolamin wird von Zellen in Albuminmedium - im Vergleich zu Kontrollzellen - verstärkt in die Phospholipide (Lecithin) eingebaut. Dabei dürfte die Synthese von Phosphatidylcholin vorwiegend über Basenaustausch und nicht über den "Kennedy Pathway" erfolgen.

13. Die Züchtung von EAT-Zellen in Suspensionskultur ist in einem chemisch definierten Medium über mehrere Passagen, wenn auch als Folge einer Selektion oder Adaption der Zellen an die neuen Kulturbedingungen, möglich.

6. Literaturverzeichnis

ADAMSON, L.P., HERINGER,A.G., BORNSTEIN,J.: Evidence for the selection by the membrane transport system of intracellular or extracellular amino acids for protein synthesis
Biochim.Biophys.Acta 282, 352-365 (1972)

ALIVISATOS,S.G.A., PAPASTAVROU,C., DROUKA-LIAPATI,E., MOLYVDAS, A.P., NIKITOPOULOU,G.: Enzymatic and Electrophysiological changes of Function of Membrane Proteins by Cholesterol, Bioch.Biophys.Res.Commun. 79, 677-683 1977

BACHRACH,U.: Polyamines as Chemical Markers of Malignancy Ital.J.Biochem.25 (1), 77-93 (1976)

BAILEY,J.M.:Lipid Metabolism in Cultured Cells IV Serum, Alpha Globulins and Cellular Cholesterol Exchange Exp.Cell. Res. 37, 175-182 (1965)

BANKS,J.R., BHAVANANDAN,V.P.,DAVIDSON,E.A.: Chemical and Biological Properties of B_{16}Murine Melanoma Cells Grown in Defined Medium Containing Bovine Serum Albumin Cancer Res. 37, 4336-4345 (1977)

BARFOD,N.M., BICHEL.P.: Characterization of a G_1-Inhibitor from Old JB-1 Ascites Tumor Fluid
Virchow.Arch.B.Cell.Path.21, 249-258 (1976)

BASERGA,R.: Multiplication and Division in Mammalian Cells Vol 6 in the Biochemistry of Desease,Marcel Dekker, New York, Basel 1976

BERGMEYER,H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse I + II Verlag Chemie, Weinheim Bergstraße 197o

BHARGAVA,P.M., VIGIER,P.: Control of the Uptake of Amino Acids by Serum in Chick Embryo Cells, Untransformed or Transformed with Rous Sarcoma Virus
J.Membrane Biol. 26, 19-3o (1976)

BIRCH,J.R., PIRT,S.J.: The Choline and Serum Protein Requirements of Mouse Fibroblast Cells (Strain LS) in Culture, J.Cell.Sci. 5, 135-142 (1969)

BIRCH,J.R., Pirt,S.J.: Improvements in a Chemically Defined Medium for the Growth of Mouse (Strain LS) in Suspension, J.Cell Sci. 7, 661-67o (197o)

BLAKER,G.J., BIRCH,J.R., PIRT,S.J.: The Glucose, Insulin and Glutamine Requirements of Suspension Culture of HeLa Cells in a Defined Culture Medium J.Cell.Sci 9, 529-537 (1971)

BONDY,S.C., HARRINGTON,M.E.: Widespread Occurence of Specific High Affinity Binding Sites for Amino Acids Biochem.Biophys.Res.Commun.80, 161-168 (1978)

BOONE,C.W., MANTEL,N., CARUSA,T.D., KAZAM.E., STEVENSON,R.E.: Quality Control Studies On Fetal Bovine Serum Used In Tissue Culture, In Vitro 7, 174-189 (1972)

BORGHETTI,A.F., TRAMACERE,M., GUIDOTTI,G.C.: Control by Serum of Amino Acid Transport and Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Cultured Avian Fibroblasts 569th Meeting, Sussex Biochem.Soc.Trans. 5, 921-923 (1977)

BRADLEY,W.E.C., CULP,L.A.: Stimulation of 2-Deoxyglucose Uptake in Growth-Inhibited BALB/C 3T3 and Revertant Exp.Cell. Res. 84, 335-350 (1974)

BROOKS,R.F.: Regulation of the fibroblast cell cycle by serum Nature 260,248-250 (1976)

BURGER,M.M.: in "Growth Control in Cell Cultures Ed.by Wolstenholme and Knight, Churchill Livingstone, Edinburgh and London 1971 pp.43-63

CECCARINI,C., EAGLE,H.: Induction and Reversal of Contact Inhibition of Growth by pH-Modification Nature New Biology 233, 271-273 (1971)

CHRISTENSEN,H.N., CESPEDES,C., HANDLOGTEN,M.E., RONQUIST,G.: Energization of Amino Acid Transport, Studies for the Ehrlich Ascites Tumor Cell Biochem.Biophys.Acta, 300, 487-522 (1973)

CLARK, L.V., WOLF,R., GRANGER,D., TAYLOR,Z.: Continous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography J.Appl.Physiol. 6, 189-193 (1953)

CLO,C., ORLANDINI,G.C., CASTI,A., GUANIERI,C.: Polyamines as Growth Stimulating Factors in Eucaryotic Cells Ital.J.Biochem.25 (1) 94-113 (1976)

CROCKETT,R.L., LESLIE,I.: Utilization of ^{14}C-labeled glucose by human cells (strain HEM) in tissue culture Biochem.J.89, 516-525 (1963)

CUNNINGHAM,D.D.: Changes in phospholipid turnover following growth of 3T3 mouse cells to confluency
J.Biol.Chem. 247, 2464-247o (1972)

DOLBERG,D.S., BASSHAM,J.A., BISSELL,M.J.: Selective Inhibition of the Facilitated Mode of Sugar Uptake by Cytochalasin B in Cultured Fibroblasts
Exp.Cell.Res.96, 129-137 (1975)

EAGLE,H.: Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture
Science 122, 5o1-5o4 (1955)

EAGLE,H.: The Sustained Growth of Human and Animal Cells In A Protein-Free Environment
Proc.Natl.Acad.Sci. 46, 427-432 (196o)

EAGLE,H.: Buffer Combinations for Mammalian Cell Culture
Science 174, 5oo-5o3 (1971)

EDSTRÖM,A., KANJE,M., WALUM,E.: Density-Dependent Inhibition of 2-Deoxy-D-Glucose Uptake into Glioma and Neuroblastoma Cells in Culture
Exp.Cell.Res.97, 6-14 (1976)

ETIENNE,P., YOUNG,S.N., SOURKES,T.L.: Inhibition by albumin of tryptophan uptake by rat brain
Nature 262, 144-145 (1976)

FODGE,D.W., RUBIN,H.: Activation of PFK by Stimulans of Cell Multiplication
Nature New Biol. 246, 181-183 (1973)

FOLCH,J., LEES,M., STANLEY,G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues
J.Biol.Chem.226, 497-5o9 (1957)

FRELIN,C., PADIEU,P.: Pleiotypic response of rat heart cells in culture to serum stimulation
Biochimie 58, 953-959 (1976)

GARCIA-SANCHO,J., SANCHEZ,A., HANDLOGTEN,M.E., CHRISTENSEN,H.N.: Unexpected additional mode of energization of amino-acid transport into Ehrlich Cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.74, 1488-1491 (1977)

GECK,P., HEINZ,E., PFEIFFER,B.: Evidence against direct Coupling between Amino acid Transport and ATP-Hydrolysis
Biochem.Biophys.Acta 339, 419-425 (1974)

GLASER,M., FERGUSON,K.A., VAGELOS,P.R.: Manipulation of the Phospholipid Composition of Tissue Culture Cells
Proc.Natl.Acad.Sci. 71, 4o72-4o76 (1974)

GOSPODAROWICZ,D., MORAN,J.S.: Growth Factors in Mammalian Cell Culture
Ann.Rev.Biochem. 45, 531-558 (1976)

GOTTSCHALK,A.: Glycoproteins p.2
Amsterdam: Elsevier 1966

GRIFFITHS,J.B.: Role of Serum, Insulin and Amino Acid Concentration in Contact Inhibition of Growth of Human Cells in Culture, Exp.Cell.Res.75, 47-56 (1972)

GRIMES,W.J., SCHROEDER,J.L.: Dibutyryl Cyclic Adenosine 3'5'-Monophosphate, Sugar Transport and Regulatory Control of Cell Division in Normal and Transformed Cells
J.Cell.Biol.56, 487-491 (1973)

HALABURT,G., HILDEN,J., JENSEN,K.B., RONNIKE,F.: The Toxicity of Human Serum Against Ehrlich Ascites Cells - An Attempt at Characterizing Responsible Components
Res.exp.Med. 165, 227-232 (1975)

HALLE,W.: Zell- und Gewebezüchtung bei Tieren
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1976

HASSEL,J.A., ENGELHARDT,D.L.: The Regulation of Protein Synthesis in Animal Cells by Serum Factors
Biochemistry 15, 1375-138o (1976)

HAUSEN,P., STEIN,H.: On the Synthesis of RNA in Lymphocytes Stimulation by Phyto hemagglutinin
Europ.J.Biochem.4, 4o1-4o6 (1968)

HEALY,G.M., PARKER,R.C.: Cultivation of Mammalian Cells in Defined Media with Protein and Nonprotein Supplements
J.Cell.Biol.3o, 539-553 (1966)

HEPP,D., PRÖSSE,E., WEISS,H., WIELAND,O.: Essigsäure als Endprodukt des aeroben Krebsstoffwechsels
Biochem.Ztschr.344, 87-1o2 (1966)

HIGUCHI,K.: Studies on the Nutrition and Metabolism of Animal Cells in Serumfree Media
J.Infect.Dis.112, 213-22o (1963)

HIGUCHI,K.: An Improved Chemically Defined Culture Medium for Strain L-Mouse Based on Growth Responses to Graded Levels of Nutrients Including Iron and Zinc Ions
J.Cell.Phys. 75, 65-72 (197o)

HIRSCHBERG,O.B.: Phospholipid Turnover In Hamster And Chick Embryo Fibroblasts
Exp.Cell.Res.110, 355-361 (1977)

HONN,K.V., SINGLEY,J.A., CHAVIN,W.: Fetale Bovine Serum: A Multivariate Standard
Proc.Soc.Exp.Biol.Med.149, 344-347 (1975)

HOWARD,B.V., HOWARD,W.J.: Lipids in Normal and Tumor Cells in Culture, Progr.biochem.Pharmacol.Vol.10, Karger Basel 1975, 135-166

HYNES,R.O.: Role of Surface Alterations in Cell Transformation. The Importance of Proteases and Surface Proteins
Cell, 1, (4) 147-156 (1974)

INFANTE,J.P.: Rate-Limiting Step in the Cytidine Pathway for the Synthesis of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine
Biochem.J. 167, 847-849 (1977)

ISRAEL und Mit.in: Polyamines as Growth Stimulating Factors in Eucaryotic Cells
Ital.J.Biochem.25, 94-113 (1976)

IVES,D.H., MORSE,P.A., POTTER,V.R.: Feedback Inhibition of Thymidine Kinase by Thymidine Triphosphate
J.Biol.Chem. 238, 1467-1474 (1963)

JOBE,A.: The Labelling and Biological Half-Life of Phosphatidylcholin in Subcellular Fractions of Rabbit Lung
Biochim.Biophys.Acta 489, 440-453 (1977)

JONES,K.L., ADDISON,J.: Studies of Human Diploid Fibroblasts Growth: Responses of Normal and Hypopituitary Cells to Fibroblast Growth Factor, Insulin and Serum
J.Endocr.Metabolism 42, 721-729 (1976)

KALTENBACH,J.P., KALTENBACH,M.H., LYONS,W.B.: Nigrosin as a dye for differentiating live and dead cells
Exp.Cell.Res. 15, 112-117 (1958)

KAMINSKAS,E.: Serum-mediated Stimulation of Protein-Synthesis in Ehrlich Ascites Tumor Cells
J.Biol.Chem. 247, 5470-5476 (1972)

KAMINSKAS,E.: Inactivation of Protein Synthesis Stimulating Activity in Serum by Cells
J.Cell.Physiol.82, 475-488 (1973)

KAMINSKAS,E.: Cell-Serum Factor Interaction
Exp.Cell.Res.94, 7-14 (1975)

KAMINSKAS,E., FIELD,M., HENSHAW,E.C.: Cyclic AMP and Growth of Ehrlich Ascites Tumor Cells
Biochem.Biophys.Acta 444, 539-553 (1976)

KARZEL,K., BREULL,W.: Beziehung zwischen Zellvermehrung, Zellvolumen, Protein- und DNS-Gehalt bei Suspensionskulturen von Ehrlich-Ascites Tumorzellen
Arzneimittelforschung 18, 1504-1506 (1968)

KARZEL,K., SCHMID,J.: Über einige biologische Eigenschaften eines permanent in vitro wachsenden Stammes von Ehrlich-Ascites Tumorzellen. Arzneimittelforschung 18 1500-1504 (1968)

KAVANAU,J.L.: Structure and Function in Biological Membranes Vols I und II, San Francisco: Holden Day 1965

KLETZIEN,R.F., PERDUE,J.F.,: Sugar Transport in Chick Embryo Fibroblasts
J.Biol.Chem.249, 3366-3374 (1974)

KNUTSON,F., LUNDIN,P.M., NORBY,K.: Syngeneic serum and ascitic fluid in enzymatically produced tumour cell suspensions, Path.europ.Vol.6, 34-42 (1971)

KOIZUMI,K., TAMIYA-KOIZUMI,K., FUJII,T., KOJIMA,K.: Phospholipids of Plasma Membranes Isolated from Rat Ascites Hepatomas and from Normal Rat Liver
Cell Structure And Function 2, 145-153 (1977)

KRAUSE,H.P.: Untersuchungen über die Bedeutung von Atmung und Glykolyse für Zellvermehrung und Energiestoffwechsel von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen
Dissertation, Marburg 1975

KUMMER,D.: Einfluß der Glucose auf die ^{14}C-Thymidin-Einbaurate von Ehrlich Ascitescarcinomazellen in vitro
Nuklear-Medizin, Vol VIII No 2, 195-206 (1969)

LEMONNIER,F., GAUTIER,M., MOATTI,N., LEMONNIER,A.: Comparative Study of Extracellular Amino Acids in Culture of Human Liver and Fibroblastic Cells
In Vitro 12, 460-466 (1976)

LESLIE,I., FULTON,W.C., SINCLAIR,R.: The influence of the medium on the insulin response of two unrelated human cells grown in tissue culture
Biochem.J. 63, 18P-19P (1956)

LIVE,T.R., KAMINSKAS,E.: Changes in Adenylate Energy Charge in Ehrlich Ascites Tumor Cells Deprived of Serum, Glucose or Amino Acids
J.Biol.Chem. 23o, 1786-1789 (1975)

LÖFFLER,M., POSTIUS,S., SCHNEIDER,Fr.: Anaerobiosis and Oxygen Recovery: Changes in Cell Cycle Distribution of Ehrlich Ascites Tumor Cells Grown in vitro
Virchows Arch.B.Cell Path. 26, 359-368 (1978)

MEEDEL,T.H., LEVINE,E.M.: Messenger RNA regulation in human diploid fibroblasts
J.Cell.Physiol.9o, 211-223 (1977)

MEEDEL,T.H., LEVINE,E.M.: Regulation of Protein Synthesis in Human Diploid Fibroblasts: Reduced Initiation Efficiency in Resting Cultures
J.Cell.Physiol.94, 229-242 (1978)

MILLER,O.L., STONE,G.E., PRESCOTT,D.M.: Autoradiography of soluble materials
J.Cell.Biol.25, 654-658 (1964)

NAGLE,S.C., TRIBBLE,H.R., ANDERSON,R.E., GARY,N.D.: A Chemically Defined Medium for Growth of Animal Cells in Culture
Proc.Soc.Exp.Med.112, 34o-344 (1963)

NEFF,N.T., ROSS,P.A., BARTHOLOMEW,J.C., BISSELL,M.J.: Leucine in Cultured Cells
Exp.Cell.Res.1o6, 175-183 (1977)

NORDENSKÖLD,B.A., SOOG,L., BROWN,N.G., REICHARD,P.: Deoxyribonucleotide Pools and Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Cultured Mouse Embryo Cells
J.Biol.Chem. 245, 536o-5368 (197o)

OHTA,S., TAKAOKA,T., KATSUTA,H.: Nutritional Requirements of Rat Ascites Hepatoma Cells of Strain JTC- 16 (AH-7974) in Tissue Culture
Japan.J.Exp.Med. 39, 359-367 (1969)

OKUDA,A., KIMURA,G.: Serum Stimulation of DNA-Synthesis in Rat 3Y1Cells
Exp.Cell.Res. 111, 55-62 (1978)

PAIN,V.M., HENSHAW,E.C.: Initiation of Protein Synthesis in Ehrlich Ascites Tumor Cells
Europ.J.Biochem.57, 335-342 (1975)

PETERS,Jr.Th.: Serum Albumin: in The Plasma Proteins Ed.by Rutnam,Academic Press, New York 1975

PETERSON,J.A., RUBIN,H.: The Exchange of Phospholipids Between Cultured Chick Embryo Fibroblasts and Their Growth Medium, Exp.Cell.Res. 58, 365-378 (1969)

PETZ,D.: DNS-, RNS- und Proteinsynthese von Ehrlich-Ascites-Tumor Zellen unter verschiedenen Bedingungen der Energieversorgung, Diplomarbeit Marburg 1971

PLAGEMANN,P.G.W.: Choline Metabolism and Membrane Formation in Rat Hepatoma Cells Grown in Suspension Culture. Incorporation of Choline into Phosphatidylcholine of Mitochondria and other Membranous Structures and Effect of Metabolic Inhibitors
Arch.Bioch.Biophys.113, 7o-87 (1968)

PLAGEMANN,P.G.W.: Choline Metabolism And Membrane Formation in Rat Hepatoma Cells Grown in Suspension Culture
J.Cell.Biol.42, 766-782 (1969)

PLAGEMANN,P.G., ROTH,M.F.: Permeation as the Rate-Limiting Step in the Phosphorylation of Uridine and Choline and Their Incorporation into Macromolecules by Novikoff Hepatoma Cells
Biochemistry 8, 4782-4789 (1969)

PLAGEMANN,P.G.W.: Nucleotide Pools in Novikoff Rat Hepatoma Cells Growing in Suspension Culture. J.Cell.Biol.52 131-146 (1972)

PLAGEMANN,P.G.W., RICHEY,D.P.: Transport of Nucleosides, Nucleic Acid Bases, Cholin and Glucose by Animal Cells in Culture, Biochem.Biophys.Acta 344,263-3o5 (1974)

PLAGEMANN,P.G.W., RICHEY,D.P., ZYLKA,J.M., ERBE,J.: Cell Cycle and Growth State-Dependent Changes in the Transport of Nucleosides, Hypoxanthine, Choline and Deoxyglucose in Cultured Novikoff Rat Hepatoma Cells
J.Cell.Biol.64, 29-41 (1975)

POLET,H., SPIEKER-POLET,H.: Serum Albumin is Essential for in Vitro Growth of Activated Human Lymphocytes
J.Exp.Med.142, 949-959 (1975)

RANDERATH,K.: An Evaluation of Film Detection Methods for Weak ß-Emitters, Particularly Tritium
Analytical Biochem. 34, 188-2o5 (197o)

RENNER,E.D., PLAGEMANN,P.G.W., BERNLOHR,R.W.: Permeation of Glucose by Simple and Facilitated Diffusion by Novikoff Rat Hepatoma Cells in Suspension Culture and Its Relationship to Glucose Metabolism
J.Biol.Chem.247, 5765-5776 (1972)

RIDDER,J.J.M.De.: The Uptake of Choline by Rat Liver Mitochondria
Biochim.Biophys.Acta 449, 236-244 (1976)

ROSE,A.H.: Lipid Composition and Plasma Membrane Function in Anaerobically-Grown Saccharomyces Cerevisiae
Euchem.Conference on Metabolic Reactions in the Yeast Cell in Anaerobic and Aerobic Conditions
Helsinki 1977, 27-28

ROUX,J.M., SWIERCZEWSKI,E.Hoogen-RAAD,N.J.: Possible Compartimentalisation of the de novo and Salvage Pathway of UMP Synthesis in Stimulated Mouse Salivary Glands System
Hoppe Seyler's Ztschr.f.Phys.Chem.358, 1267 (1977)

RUBIN,H.: pH and Population Density in the Regulation of Animal Cell Multiplication
J.Biol.Chem.51, 686-7o2 (1971)

RUBIN,H.: in "Wolstenholme und Knight (1971) pp.127-149

RUSSEL,D.H.: Polyamines in Normal and Neoplastic Growth
Raven Press, New York (1973)

RYSER,H., CAULFIELD,J.B., AUB,J.C.: Studies on Protein Uptake by Isolated Tumor Cells
J.Cell.Biol.14, 255-268 (1962)

SCHAER,J.C., SCHINDLER,R.: The Requirements of mammalian cell cultures for Serum Proteins. Growth Promotion Activity of Pepsin-Digested Serum Albumin in Different Media, Biochim.Biophys.Acta 147,154-161 (1967)

SCHINDLER,R., DAY,M., FISCHER,G.A.: Culture of Neoplastic Mast Cells and Their Synthesis of 5-Hydroxytryptamine and Histamine in Vitro.
Cancer Res.19, 47-51 (1959)

SCHINDLER,R.: Die tierische Zelle in Zellkultur
Springer-Verlag, Heidelberg, New York, 1965

SCHNEIDER,P.B.: Stimulation by serum of ^{32}P incorporation into the Phospholipids of Ehrlich Ascites Cells
J.Lipid Res.18, 239-245 (1977)

SCHREIER,M.H., STAEHLIN,T.: Initiation of Eucaryotic Protein Synthesis: (Met-t RNA_f 4o S Ribosome) Initiation Complex Catalysed by Purified Initiation Factors in the Absence of mRNA
Nature New Biology 242, 35-38 (1973)

SCHUHMANN,J., GÖHDE,W.: Die zellkinetische Wirkung von Bleomycin auf das Ehrlich Karzinom der Maus in vivo
Strahlentherapie 147, 298-3o7 (1974)

SEFTON,B.M., RUBIN,H.,: Stimulation of Glucose-Transport in Cultures of Density-Inhibited Chick Embryo Cells
Proc.Natl.Acad.Sci. 68, 3154-3157 (1971)

SHIEDDS,R.: Polyamines and Growth Control, Nature 261, 455 (1976)

SINGER,S.J., NICOLSON,G.L.: The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, Science 175, 72o-731 (1972)

SPECTOR,A.A.: Fatty Acid binding to plasma albumin
J.Lipid.Res. 16, 165-179 (1975)

SPIEKER-POLET,H., POLET,H.: Identification of Albumin as the Serumfactor Essential for the Growth of Activated Lymphocytes
J.Biol.Chem.251, 987-992 (1976)

STAMBROOK,P.J., SISKEN,J.E.: Induced Changes in the Rates of Uridine^{3}H-Uptake and Incorporation During G_1 and S Periods of Synchronized Chinese Hamster Cells.
J.Cell Biol.52, 511-525 (1972)

STIZER,L.K., JACQUEZ,J.A.: Neutral Amino Acid Transport Pathways in uptake of L-thyroxine by Ehrlich Ascites Cells, American J.Physiol. 229, 172-177 (1975)

SWIERCZEWSKI,E., ROUX,J.M.: Incorporation of Radioactive Precursors into Nucleic Acids in Relation to the Activity of Enzymes Associated with Control Steps of Pyrimidine Nucleotide Pathways in the Developing Rat Liver
Hoppe Seyler's Zschr.f.Phys.Chem. 358, 1233 (1977)

SUNG,C.P., JONHSTONE,R.M.: Evidence for Active Transport of Choline in Rat Kidney Cortex Slices
Can.J.Biochem. 43, 1111 (1965)

SUNDLER,R., ARVIDSON,G., AKESSON,B.: Pathways for the Incorporation of Choline Into Rat Liver Phosphatidylcholine In Vivo
Biochim.Biophys.Acta 28o, 559-568 (1972)

TABOR,C.W., TABOR,H.: 1,4-Diaminobutane (Putrescine) Spermidine And Spermine
Annual Rev.of Biochem 45, 285-3o5 (1976)

TAKAOKA,T., KATSUTA,H.: Long-Term Cultivation of Mammalian Cell Strains in Protein-and Lipid Free Chemically Defined Synthetic Media
Exp.Cell. Res. 67, 295-3o4 (1971)

THOMAS,J.A., JOHNSON,M.J.: Trace metal requirements of NCTC clone 929 strain L cells.
J.Natl.Cancer Inst. 39, 337-345 (1967)

THOMAS,D.B.: Regulation of Mammalian Cell Cycle in vitro
Biochem.Soc.Trans.5, 18o1-18o8 (1977)

TREBLE,D.H., FRUMKIN,S., BALINT,J.A., BEELER,D.A.: The Entry of Choline into Lecithine In Vivo by Base Exchange
Biochim.Biophys.Acta 2o2,163-171 (197o)

TRIBBLE, H.R., HIGUCHI,K.: Studies on the Nutrition And Metabolism of Animal Cells in Serumfree Media
Journ.Infect.Dis.112, 221-225 (1963)

TUPPER,J.T., MILLS,B., ZORGNIOTTI,F.: Membrane Transport in Synchronized Ehrlich Ascites Tumor Cells: Uptake of Amino Acids by the A-and L-System during the Cell Cycle, J.Cell.Physiol. 88, 77-87 (1976)

TYLER,D.D.: Transport and Oxidation of Choline by Liver Mitochondria 166, 571-587 (1977)

WALUM,E., EDSTRÖM,A.: Alterations in the Characteristics of 2-Deoxy-D-Glucose Transport Into Cultured Human Glioma Cells During Cell Growth
Exp.Cell Res. 1oo, 111-116 (1976)

WELCH,C.L., WOOD,R.: Lipids of Cultured Hepatoma Cells VIII Utilization of D-(1^{14}-C) Glucose for Lipid Biosynthesis, Lipids 12, 245-253 (1977)

WERNSTEDT,C.O., AGREN,G.K., RONQUIST,G.: Enzyme Activities at The Surface of Intact Ehrlich Tumor Cells with Albumin in the Isotonic Assay Medium
Cancer Res 35, 1536-1541 (1975)

WILHELM,G., SCHULTZ,J., HOFFMANN,E.: pH-Dependence of aerobic Glycolysis in Ehrlich Ascites Tumor Cells
FEBS Letters , 17 (1), 159-161 (1971)

WILSON,W.D. and FOSTER,J.F.: Confirmation-Dependent Limited Proteolysis of Bovine Plasma Albumin by an Enzyme Present in Commercial Albumin Preparations
Biochemistry 1o, 1772.178o (1971)

WOLF,G., ZEHL,U., STERBA,G.: Proteinbestimmung mit Amidoschwarz in essigsaurer Sublimatlösung
Acta biol.med.germ.33, K 63-K65 (1974)

WOLSTENHOLME,G.E.W., KNIGHT,J.: Growth Control in Cell Culture
Churchill Livingstone (1974)

WOO,K.B., WILG,K.M., BRENKUS,L.M.: Variation of Cell Kinetic Parameters in Relation To The Rate of The Ehrlich Ascites Tumor
Cell.Tissue Kinet. 8, 387-39o (1975)

WURSTER,U.: Synchronisation von Ehrlich Ascites Kulturzellen durch kombinierte Anwendung von Hemmern der Synthesephase und der Mitose innerhalb eines Zellzyklus
Biochemische Diplomarbeit, Tübingen 197o

YAMANE,J., MURAKAMI,O., KATO,M.: Role of Bovine Albumin in a serum-free Suspension Culture Medium (38823)
Proc.Soc.Exp.Biol.Med.149, 439-442 (1975)

YOST,B.K., ROSENBERG,M.J., NISHIOKA,D.J.: Incorporation of Tritiated Uridine into DNA of Ehrlich Ascites Tumor Cells, J.Natl.Cancer Inst. 57, 289-293 (1976)

ZILVERSMIT,D.B., HUGHES,M.E.: Extensive Exchange of Rat Liver Microsomal Phospholipids, Biochim.Biophys.Acta 469, 99-11o (1977)

LEBENSLAUF

1o.1.1952	geboren in Heldenbergen als 1.Kind des Clemens Teschner und seiner Frau Paula, geb.Prothmann
1958 - 1962	Besuch der Volksschule Heldenbergen
1962 - 197o	Besuch des Mädchengymnasiums St.Lioba in Bad-Nauheim
1o.6.197o	dort Ablegung der Reifeprüfung
WS 197o/71 - SS 71	Studium der Haushalts- und Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Wilhelm Universität Bonn
SS 1971	Vordiplom I
WS 1971/72 - SS 75	Fortsetzung des Studiums an der Justus-Liebig-Universität Giessen
SS 1972	Vordiplom II
25.4.1975	Diplom Hauptprüfung Thema der Diplomarbeit: Einfluß des Alters und der Ernährung auf die Enzymaktivität von Leber und Blut bei Versuchstier und Mensch
Seit August 1975	beschäftigt am Physiol.-Chem.Inst.II der Philipps-Universität Marburg
WS 1975/76 - WS 77/78	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg und Dissertation unter der Anleitung von Prof.Dr.Fr.Schneider über "Untersuchungen über die Kultivierung von Ehrlich Ascites Tumorzellen in chemisch definierten Medien"

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten

in Bonn:

Brinkmann, Drescher, Dörr, Franke, Gerl, Greuel, Gottschalk,
Kick, Pera, Schuermann, Skomroch, Zurek,

in Giessen:

Ahrens, Bartels, Bodenstedt, Brune, v.Campe, Feldheim,
Hadlock, Heilenz, Huth, Jahn, Jekat, Kielwein, Klare,
Knoll, Küster, Lindner, Linser, Meimberg, Menden, Meyer,
Muskat, Neumann, Noelle, Pauls, Rehner, Renner, Schmucker,
Schulze, Schweitzer, Stein, Tolckmitt, Wagner, Wucherpfennig,
Wünnenberg, Zilahi-Szabo,

in Marburg:

Aziz, Braasch, Dennhardt, Doss, Egbring, Follmann, Fruhstorfer,
Gallwitz, Golenhofen, Haberich, Hensel, Hildebrandt, Kadenbach,
Kaffarnik, Karlson, Koransky, v.Kraft, Lorenz, Niessing, Priebe,
Quast, Schachtschabel, Fr.Schneider, Schulte-Herrmann, Schwick,
Seifart, Sturm, Wesemann, Wiegandt.